

Entwicklung von Analyseverfahren zur Bestimmung von Ochratoxin A in Lebensmitteln

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Staatl. gepr. Lebensmittelchemiker Martin Reinsch

geboren am 05.02.1974 in Allenstein/Polen

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin in Vertretung

Prof. Dr. H. J. Prömel

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. T. Buckhout, Ph D

Gutachter: 1. Prof. Dr. U. Panne
2. Prof. Dr. M. Linscheid

Tag der mündlichen Prüfung: 07.06.2006

Publikationen

M. Reinsch, A. Töpfer, A. Lehmann, I. Nehls, „*Determination of ochratoxin A in wine by LC-MS/MS after combined anion exchange/reversed phase clean-up*“, Anal and Bioanal Chem (2005) 381: 1592-1595.

M. Reinsch, A. Töpfer, A. Lehmann, I. Nehls, U. Panne, „*Determination of ochratoxin A in beer by LC-MS/MS ion trap detection*“ akzeptiert als Publikation in Food Chemistry.

Poster

„Untersuchung zur Herstellung Ochratoxin A belasteter Referenzmaterialien“, InCom, Düsseldorf 2003 (Tagungsband).

„Vergleich von Extraktionstechniken zur Bestimmung von Ochratoxin A in Röstkaffee“, Tag der Chemie, Universität Potsdam, Golm 2004.

„Bestimmung von Ochratoxin A in Wein mittels LC-MS/MS nach kombiniertem Anionenaustauscher/Resersed Phase clean up“, 33. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Bonn 2004 (Tagungsband).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Das wären vor allem:

- Herr Prof. Dr. Panne (BAM, Humboldt Universität Berlin), für die Unterstützung und die kritische Hinterfragung zahlreicher Details.
- Frau Prof. Dr. Nehls für die Aufnahme in ihre Fachgruppe, die vorzügliche instrumentelle Ausstattung und die Freiräume, die sie mir während meiner Promotion gewährt haben

Des weiteren gilt mein besonderer Dank den Kollegen aus der Fachgruppe I.2 sowie der Abteilung I, die mich Tag für Tag begleitet und in jeglicher Form unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt hier vor allem:

- Frau Dr. Antje Töpfer für die inhaltlichen Diskussionen, die konstruktive Kritik und die unkomplizierte kollegiale Zusammenarbeit.
- Herrn Dr. Andreas Lehmann für die fundierte Einführung in die Welt der Massenspektrometrie, das Vertrauen in meine Fähigkeiten und die fürsorgliche Bereitstellung der täglichen Dosis Kaffee.
- Herrn Dr. Wolfgang Walther für die Hilfsbereitschaft bei allen Fragen und die interessanten Anregungen.
- Allen Kollegen und Kolleginnen der Fachgruppe I.2 sowie der Abteilung I für die Hilfsbereitschaft und ganz besonders: Sigrid Gräfe und Gabrielle Rhode für die Unterstützung im Laboralltag, Dominik Weimann für die Hilfe innerhalb der Methodenentwicklung und -validierung, Christian Jung für die LC-FLD Messungen und die Hilfe im Technikum, Herrn Dr. Wolfgang Bremser für die statistischen Auswertungen der Stabilitäts- und Homogenitätstests und Dr. Frank Malz für die NMR-Messungen.
- Stefanie Pötz und Almuth Liebich (unsere Büro-WG) möchte ich für die angenehmen und vor allem konstruktiven zwei Jahre in unserem gemeinsamen Büro danken.

Außerhalb meines Arbeitsumfeldes möchte ich vor allem meiner Familie für das Ermöglichen eines sorglosen Studiums danken, welches die Grundlage für meinen akademischen

Werdegang bildete. Des weiteren danke ich meinen Freunden für die moralische Unterstützung innerhalb der letzten Jahre. Und selbstverständlich danke ich allen, die sich angesprochen fühlen und in dieser Aufzählung vergessen wurden.

Selbstständigkeitserklärung

Die vorliegende Arbeit wurde von Martin Reinsch im Labor I.23 der Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung im Zeitraum vom Mai 2002 bis April 2005 angefertigt. Es wurden keine weiteren als die hier aufgeführten Hilfsmittel und Literaturquellen verwendet.

Berlin, den 21. Dezember 2005

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	13
2	Problemstellung und Zielsetzung	14
3	Grundlagen	15
3.1	Mykotoxine allgemein	15
3.2	Ochratoxin A	16
3.2.1	Vorkommen von Ochratoxin A	17
3.2.2	Biosynthese	17
3.2.3	Analoge Verbindungen	19
3.2.4	Toxikologische Bewertung	19
3.2.5	Physikalisch- chemische Eigenschaften	20
3.2.6	Gesetzliche Regelungen	20
3.2.7	Analytik von Ochratoxin A	21
3.3	Extraktionstechniken und clean-up	23
3.3.1	Ultraschall-Extraktion	23
3.3.2	Beschleunigte Lösemittelextraktion (ASE®)	24
3.3.3	Festphasenextraktion (SPE)	24
3.3.4	Extraktion und clean-up mit Immunaффinitätssäulen	25
3.3.5	Kombiniertes Umkehrphasen/Anionenaustauscher clean-up	26
3.4	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	27
3.4.1	Detektionstechniken	28
3.5	Massenspektrometrie	28
3.5.1	Ionisationstechniken	29
3.5.2	Massenanalysatoren	31
3.5.3	LC-MS/MS Kopplung	32
4	Entwicklung von Analyseverfahren zur Bestimmung von OTA in Lebensmitteln	33
4.1	OTA Stammlösungen	33
4.1.1	Herstellung	33
4.1.2	Stabilität von OTA-Standardlösungen	35
4.2	Optimierung der HPLC-MS/MS Parameter	39
4.2.1	Optimierung der HPLC-Parameter	39
4.2.2	Optimierung der massenspektrometrischen Parameter (Ionenfalle)	40
4.3	Bestimmung von OTA in Rot- und Glühwein	43
4.3.1	Probenvorbereitung	43
4.3.2	Methodenentwicklung	43
4.3.3	Validierung des Verfahrens	48
4.3.3.1	Linearität	48
4.3.3.2	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	49

4.3.3.3	Präzision	50
4.3.3.4	Richtigkeit	52
4.3.3.5	Robustheit	55
4.4	Bestimmung von OTA in Bier	58
4.4.1	Probenvorbereitung	58
4.4.2	Methodenentwicklung	58
4.4.3	Validierung des Verfahrens	62
4.4.3.1	Linearität	63
4.4.3.2	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	63
4.4.3.3	Präzision	64
4.4.3.4	Richtigkeit	64
4.4.3.5	Robustheit	65
4.5	Bestimmung von OTA in Röstkaffee	68
4.5.1	Probenvorbereitung	68
4.5.2	Methodenentwicklung	69
4.5.2.1	Optimierung der Extraktionstechniken	69
4.5.2.2	Bestimmung von OTA mittels LC-MS/MS (TSQ)	71
4.5.3	Validierung des Verfahrens	75
4.5.3.1	Linearität	75
4.5.3.2	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	76
4.5.3.3	Präzision	76
4.5.3.4	Richtigkeit	78
4.5.3.5	Robustheit	79
4.6	Anwendbarkeit des Verfahrens auf weitere Matrices	81
4.6.1	Bestimmung von OTA in Chili	81
4.6.2	Bestimmung von OTA in Weizen	83
4.6.3	Validierung der Verfahren	85
5	Probenmaterial	86
5.1	Stabilität von Ochratoxin A in Rotwein	86
5.1.1	Stabilitätsstudie	86
5.1.2	Ergebnisse und Schlussfolgerung	87
5.2	Homogenität von Ochratoxin A in Röstkaffee	89
5.2.1	Siebfraktionierung	89
5.2.2	Bestimmung der OTA-Gehalte in den Siebfractionen	90
5.2.3	Bestimmung der Homogenität und Extrahierbarkeit von OTA in Röstkaffee	91
6	Zusammenfassung und Ausblick	93
7	Anhang	95
7.1	Instrumentelle Ausstattung	95
7.1.1	LC-MS/MS Systeme	95

7.1.2	Extraktionsgeräte	96
7.1.3	Weitere Laborgeräte	96
7.2	Materialien und Chemikalien	97
8	Abbildungsverzeichnis	99
9	Tabellenverzeichnis	100
10	Gleichungen	101
11	Lebenslauf	102
12	Literaturverzeichnis	104

Häufig verwendete Abkürzungen

APCI	engl. Atmospheric Pressure Chemical Ionization (chemische Ionisation unter Atmosphärendruck)
ASE	engl. Accelerated Solvent Extraction (beschleunigte Lösungsmittel-extraktion) (Beschleunigte Lösemittelextraktion)
EIC	engl. Extracted Ion Chromatogramm (extrahiertes Ionen-chromatogramm)
C18	Octadecylsilan
ZRM	zertifiziertes Referenzmaterial (engl. Certified Reference Material)
DIN	Deutsche Industrie Norm
DON	Deoxynivalenol
engl.	englisch
EN	Europäische Norm
ESI	engl. Electrospray Ionization (Elektrosprayionisation)
FLD	Fluoreszenz Detektion
HPLC	engl. High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssig-chromatographie)
IA-	Immunaффinität-
LC	engl. Liquid Chromatography (Flüssigchromatographie)
LOD	engl. Limit of Detection (Nachweisgrenze)
LOQ	engl. Limit of Quantification (Bestimmungsgrenze)
MRM	engl. Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
n	Anzahl an unabhängigen Wiederholmessungen
OTA	Ochratoxin A
OTB	Ochratoxin B
RP	engl. Reversed Phase (Umkehrphase)
SPE	engl. Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
SRM	engl. Single Reaction Monitoring
TIS®	engl. Turbo Ion Spray (vgl. ESI)
TSQ	engl. Triple Stage Quadrupol

vgl.	vergleiche
WF	Wiederfindung
z.B.	zum Beispiel
ZEA	Zearalenon

1 Einleitung

Mykotoxine sind giftige Naturstoffe, die im Rahmen des Sekundärstoffwechsels von diversen Schimmelpilzen gebildet werden. Inzwischen sind über 400 Metabolite bekannt, die sich vor allem in ihrer toxischen Wirkung und chemischen Struktur unterscheiden. Mykotoxine und in diesem Zusammenhang stehende Krankheiten treten schon seit dem Beginn des Ackerbaues auf. Bereits im Mittelalter sind Epidemien mit oft tödlichem Ausgang nach dem Genuss von Roggenbrot vorgekommen (Mutterkorn). Auch in der modernen Massentierhaltung blieben gesundheitliche Schäden an Tieren und ökonomische Verluste in Millionenhöhe, hervorgerufen durch Mykotoxine, nicht aus. Eine als 'Turkey X' bezeichnete mysteriöse Krankheit führte zum Tod von 100.000 jungen Truthähnen. Durch den Einsatz moderner Analytik wurden als Ursache Stoffwechselprodukte des Schimmelpilzes *Aspergillus flavus* im Futter aus brasilianischem Erdnussmehl nachgewiesen.

Ein weiteres bekanntes Mykotoxin ist das Ochratoxin A (OTA). Es wird als mögliches menschliches Kanzerogen eingestuft. In den letzten Jahren wurde OTA in zahlreichen Lebens- und Futtermitteln bestimmt. Da es sich um Lebensmittel handelt, die eine große Rolle in den Ernährungsgewohnheiten der Europäer einnehmen, ist eine stetige Gefährdung durch OTA gegeben. Desweiteren wurde OTA in menschlichem und tierischem Blut und Gewebe nachgewiesen und mit zahlreichen Mykotoxikosen, sowohl beim Menschen als auch beim Tier, in Verbindung gebracht.

Letztendlich führten die gesundheitliche Gefährdung des Verbrauchers sowie wirtschaftliche Einbußen in der Landwirtschaft zur Festlegung von Höchstwerten für OTA innerhalb der Europäischen Union. Daneben existieren auch einzelstaatliche Bestimmungen zur Reglementierung von OTA. Zur Kontrolle dieser Grenzwerte müssen Analysemethoden entwickelt und bereitgestellt werden.

2 Problemstellung und Zielsetzung

Gegenwärtig existieren standardisierte Verfahren zur Bestimmung von OTA in Röstkaffee und Getreide sowie Bier und Wein [54, 55]. Bei diesen Verfahren wird OTA durch mehrere clean-up- und Extraktionsschritte aus der Matrix isoliert und anschließend mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und Fluoreszenzdetektion (FLD) bestimmt. Die Probenvorbereitung ist zeitintensiv, kostspielig und für jedes Lebensmittel unterschiedlich. Innerhalb dieser Arbeit sollen neue Verfahren zur Bestimmung von OTA in Lebensmitteln entwickelt werden, wobei die technische Entwicklung im instrumentellen und präanalytischen Bereich berücksichtigt wird. In diesem Zusammenhang soll vor allem die Kopplung von Hochleistungsflüssigchromatographie und zweidimensionaler Massenspektrometrie (LC-MS/MS) sowie neue Möglichkeiten innerhalb des clean-up geprüft werden. Letztendlich sollen die neuen Verfahren robust, vergleichbar und schneller durchführbar als bisherige Verfahren sein. Weiterhin sollen OTA-Gehalte deutlich unter den festgelegten Grenzwerten bestimmt werden, um möglichen Änderungen innerhalb der Grenzwerte flexibel entgegenzutreten zu können. Die neuen Verfahren werden mit den standardisierten verglichen und validiert.

Bei der Entwicklung neuer Analysenverfahren sind Kenntnisse über die Stabilität und Homogenität des Analyten in der jeweiligen Matrix sehr wichtig. Deshalb werden in dieser Arbeit Stabilitätsuntersuchungen von OTA in Rotwein, wobei eine mögliche Instabilität in Gegenwart von Wasser und Alkohol untersucht werden soll, durchgeführt. Die Ergebnisse sollen auf die Stabilität von OTA in anderen wasser- und/oder alkoholhaltige Lebensmitteln, wie z.B. Säfte, abgeleitet werden. Weiterhin soll eine Homogenitätsstudie mit einem dotierten Röstkaffee durchgeführt werden. Neben der Dotierung des Materials beinhaltet diese Studie die Homogenisierung, Konfektionierung sowie Untersuchung der einzelnen Siebfraktionen auf OTA. Da es gerade bei Kaffee sehr schwierig ist, homogenes Probenmaterial mit OTA-Gehalten im Spurenbereich zu beziehen, ist die Dotierung unbelasteten Kaffees sowie die Bestimmung der Homogenität für diese Arbeit unerlässlich.

Neben den genannten Faktoren läßt sich mit den erzielten Ergebnissen aus Homogenitäts- und Stabilitätstests und der Methodvalidierung die Messunsicherheit des jeweiligen Verfahrens eingrenzen.

3 Grundlagen

3.1 Mykotoxine allgemein

Mykotoxine sind giftige Naturstoffe, die im Rahmen des Sekundärstoffwechsels von bestimmten Pilzen beim Wachstum auf pflanzlichen Substraten gebildet werden. Mehr als 400 Pilzmetabolite mit toxischer Wirkung sind mittlerweile der Gruppe der Mykotoxine zuzuordnen. Bezogen auf Struktur, physikochemische Eigenschaften und Toxizität handelt es sich um eine sehr heterogene Stoffklasse. Die meisten Schimmelpilze gehören zu den Deuteromyceten, genauer zu den Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium*, und *Fusarium* [1, 2].

Den größten Einfluss auf die Bildung von Mykotoxinen haben die Art der Lagerung, die Anbaubedingungen sowie der Herstellungsprozess vom Rohstoff bis zum fertigen Lebensmittel. Gerade traditionelle Verfahren, wie die Trocknung von Trauben bei der Rosinenproduktion, begünstigen die Bildung von Mykotoxinen. Eine weitere, äußerst unrühmliche Maßnahme, ist das Eintauchen ganzer Kaffeesäcke in Wasser, um höhere Preise durch die Gewichtszunahme zu erzielen.

Aufgrund der Produktion von Toxinen haben die genannten Schimmelpilze große Bedeutung für die Land- und Viehwirtschaft. Jährlich entstehen Einbußen in Millionenhöhe aufgrund von Mykotoxikosen bei Nutztieren sowie kontaminierten und damit unbrauchbaren Agrarprodukten [3]. Aber auch für die Menschen stellen durch Mykotoxine hervorgerufene Erkrankungen eine ernstzunehmende Gefahr dar.

Mykotoxikosen treten schon seit Beginn des Ackerbaues auf. Bereits im Mittelalter sind Epidemien mit oft tödlichem Ausgang nach dem Genuss von Roggenbrot aufgetreten (Mutterkorn). Letztlich war es auch die moderne Massentierhaltung, die deutlich machte, welche großen gesundheitlichen Schäden und ökonomische Verluste durch Pilzgifte hervorgerufen werden können. Anfang der 1960er-Jahre führte die als 'Turkey X' bezeichnete mysteriöse Krankheit zum Tod von 100.000 jungen Truthähnen. Als Ursache wurden Stoffwechselprodukte des Schimmelpilzes *Aspergillus flavus*, die Aflatoxine, im Futter von brasilianischem Erdnussmehl nachgewiesen. Akute Vergiftungen beim Menschen mit Todessfolge wurden im Mai 2004 in Kenia beobachtet.

Auch das OTA hat im Zusammenhang mit der so genannten „Balkan endemic nephropathy“ (BEN), einer Erkrankung der oberen Harnwege, die in Regionen Jugoslawiens, Bulgariens und Rumäniens auftrat, unrühmliche Bekanntheit erlangt [4, 5]. Näheres dazu in Kapitel 3.2.4.

3.2 Ochratoxin A

OTA wurde 1965 von van der Merwe und seinen Mitarbeitern [6] in einem südafrikanischen Isolat des Pilzstammes *Aspergillus ochraceus* Wilhelmi bestimmt, welcher nach heutiger Nomenklatur als *Aspergillus alutaceus* bezeichnet wird. OTA besteht aus einem Dihydroisokumarin, dem Ochratoxin α (7-Carboxy-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydro-3R-methyl-isokumarin), welches über eine α -Amidbindung mit L- β -Phenylalanin verbunden ist (vgl. Abbildung 3.1)

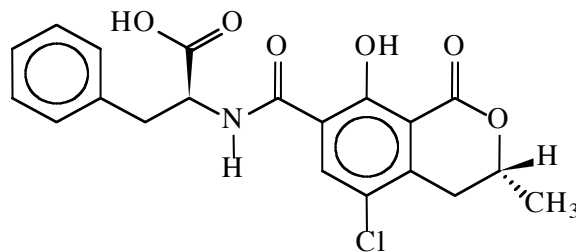


Abbildung 3.1: Struktur von OTA

Weitere OTA Produzenten sind *Aspergillus carbonarius* und *Aspergillus niger*. Diese werden mit der Bildung von OTA in Wein in Verbindung gebracht [7, 8]. *Aspergillus ochraceus* und *niger* sind für die Bildung von OTA in Rohkaffee verantwortlich [9, 10]. Neben den *Aspergillus*- wird OTA auch von verschiedenen *Penicillium*arten gebildet, wobei in den gemäßigten Klimazonen vor allem *Penicillium verrucosum*, *Penicillium viridicatum*, *Penicillium cyclopium* und *Penicillium chrysogenum* beim Lebensmittelverderb eine Rolle spielen. Dabei ist *Penicillium verrucosum* vor allem für die Bildung von OTA in Getreide verantwortlich [11]. *Aspergillus ochraceus* dagegen wird häufiger aus Produkten wärmerer Regionen isoliert [7]. *Penicillien* und *Aspergillen* bilden noch andere Toxine, so dass OTA mit Begleittoxinen, wie Citrinin und Penicillinsäure, vorkommen kann.

3.2.1 Vorkommen von Ochratoxin A

OTA tritt vermehrt in stärkereichen Produkten pflanzlichen Ursprungs auf. Dabei gehören Getreide und davon abgeleitete Erzeugnisse zu den bedeutendsten OTA-Quellen. Des weiteren konnte OTA in Gewürzen, Bohnen, Nüssen, Rohkaffee und Weintrauben nachgewiesen werden. Aufgrund der physikalischen Eigenschaften wird es letztendlich auch in weiterverarbeiteten Produkten wie Röstkaffee und Bier nachgewiesen. Dabei wird der Verlust von OTA während der Bierherstellung in älteren Studien auf 70-80% beziffert [12, 13]. Die überwiegend in wärmeren Gebieten vorzufindende Süßholzwurzel lieferte ebenfalls positive Befunde auf OTA. Aufgrund des Einsatzes von kontaminierten Getreideerzeugnissen als Tierfutter ist OTA ebenfalls in tierischem Blut und Gewebe nachweisbar. Da die genannten Produkte in die Nahrungskette des Menschen involviert sind, wurde OTA auch in menschlichem Urin, Muttermilch und Blut nachgewiesen [14, 15, 16, 17, 18, 19].

3.2.2 Biosynthese

OTA besteht aus L-Phenylalanin, welches über eine α -Amidbindung mit der Carboxylgruppe von 7-Carboxy-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydro-3R-methyl-isokumarin (Ochratoxin α) verknüpft ist. Phenylalanin wird aus den Zuckern Phosphoenolpyruvat (PEP) und D-Erythrose-4-Phosphat auf dem Shikimisäure-Biosyntheseweg in Mikroorganismen und Pflanzen synthetisiert und bildet eine Vorstufe für weitere aromatische Metabolite. Säugetiere sind zu dieser Synthese nicht fähig, da sie Phenylalanin als essentielle Aminosäure aufnehmen müssen. Kumin, ein Strukturanaloga von Ochratoxin α (Isokumarin), wird in höheren Pflanzen ebenfalls auf diesem Weg synthetisiert. Für den Isokumarin-Teil des OTA trifft dieser Weg jedoch nicht zu. Das wurde durch Vergleich von Biosynthesewegen analoger Pilzmetabolite für unwahrscheinlich erklärt. Beim Isokumarin-Teil des OTA geht man von einer Kopf-Schwanz-Kondensation von fünf Acetatresten aus. Es entsteht ein so genanntes Pentaketid. Dieses zählt ebenfalls zu einer Gruppe wichtiger Zwischenprodukte, den Polyketiden, in der Biogenese verschiedener Naturstoffe. Aflatoxine (Decaketide), Penicillinsäure (Tetraketide) u.a. Mykotoxine werden unter Beteiligung von Multienzymkomplexen ebenfalls über diese Zwischenprodukte gebildet.

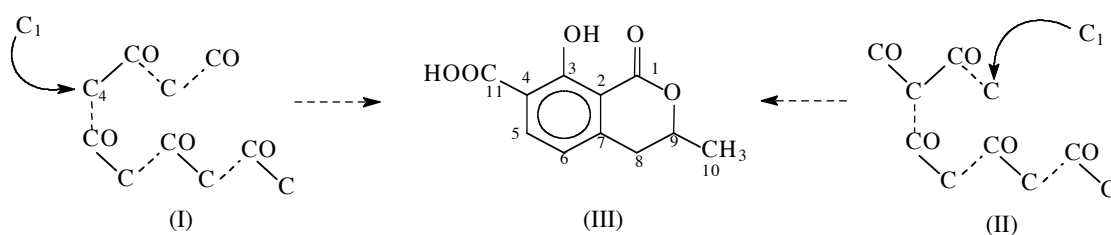


Abbildung 3.2: Biosynthese von OTβ

Nach Kondensation der Acetatreste erfolgt die Übertragung einer C₁-Einheit (I) an das C4 durch Methionin. Eine zunächst plausible Alternative (II), der Einbau einer C₁-Einheit in ein verzweigtes Pentaketid, wurde durch den Einsatz von [1-¹⁴C] markierten Acetaten widerlegt. Nach Hydrolyse des OTA und Schmid-Abbau war das aus C11 entstandene CO₂ des OTβ (III) nicht aktiv. Bekräftigt wurde die These durch die Verwendung von [¹⁴CH₃]-Methionin im Kulturmedium von *Aspergillus ochraceus*. Nach Schmid-Abbau war das entstandene CO₂ aktiv und somit auch der Einbau einer C₁-Einheit durch Methionin bestätigt. Der Einbau von Phenylalanin in OTA (IV) wurde ebenfalls durch aktives Material, das [1-¹⁴C]-Phenylalanin bestätigt. Ferreira und Pitout [20] zeigten, dass ein Gemisch aus OTA-Synthase, ATP und Mg²⁺-Ionen die Bindung von Phenylalanin an Ochratoxin α (IV) katalysiert.

Wei et al. [21] demonstrierten das Einbringen von ³⁶Cl in OTA. Zum kompletten Verlauf der Biosynthese von OTA schlagen Harris et al. den Weg OTβ→OTα→OTA vor [22, 23, 24].

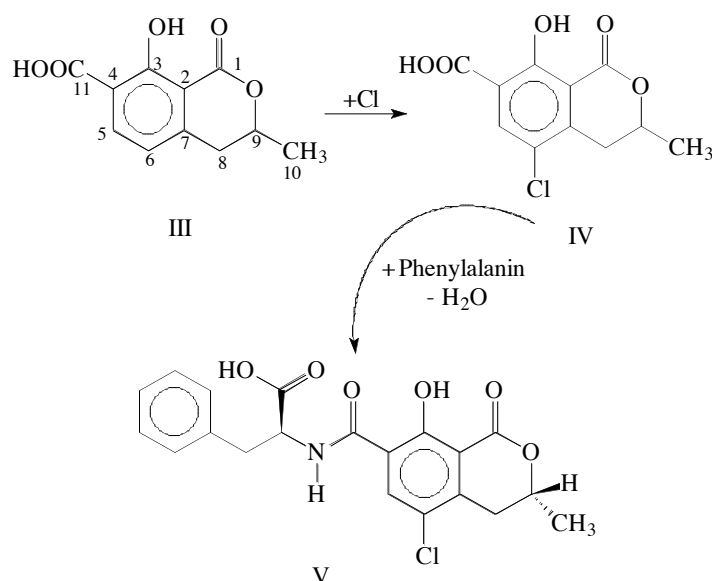


Abbildung 3.3: Biosynthese von OTA

3.2.3 Analoge Verbindungen

Neben dem OTA existieren noch weitere Ochratoxine, die eine deutlich geringere Toxizität aufweisen. Ein Vertreter ist das Ochratoxin B (OTB), welches durch Dechlorierung von OTA entsteht. Desweiteren wurden Methyl- und Ethylester des OTA und OTB beschrieben [25]. Im Stoffwechsel können hydroxylierte Formen sowie Hydrolyseprodukte des OTA gebildet werden [26, 27]. Ochratoxine mit anderen Aminosäuren als Phenylalanin sind ebenfalls dokumentiert [28, 29]. Trotz der Vielzahl möglicher OTA-Analoga sind in kontaminiertem Material überwiegend OTA und in seltenen Fällen auch OTB vorzufinden [30].

3.2.4 Toxikologische Bewertung

OTA gilt in erster Linie als ausgeprägtes Nierengift. Es wird mit der Balkan endemic nephropathy (BEN), einer chronischen Nierenerkrankung in Gebieten Südosteuropas, in Verbindung gebracht [31]. Andere epidemiologische Studien zeigen, dass OTA an der Entstehung weiterer menschlicher sowie tierischer Nierenerkrankungen beteiligt ist [32, 33]. Die Halbwertszeit bei menschlichen Probanden lag während einer Studie mit Freiwilligen bei 840 h [30]. OTA ist außerdem immunotoxisch [34, 35, 36], nephrotoxisch, zytotoxisch [17], neurotoxisch [37, 38] und besitzt teratogene sowie cancerogene [39, 40] Eigenschaften.

In neueren Studien wird OTA eine hormonelle Wirkung sowie die Induzierung des plötzlichen Zelltods (Apoptose) zugesprochen [41]. In vitro Untersuchungen an menschlichen Epithelzellen der Niere zeigten, dass OTA mit der hormonellen Ca^{2+} -Signalwirkung konkurriert, was zu veränderter Zellvermehrung führt [42, 43].

OTA wird im Gastrointestinaltrakt absorbiert und verteilt sich hauptsächlich im Blut. Es wurde auch in den Nieren, der Leber und im Fettgewebe verschiedener Tierarten gefunden.

Beim Wirkungsmechanismus scheint –aufgrund seiner Elektronegativität– das Chloratom an C5 eine entscheidende Rolle zu spielen, da die dechlorierte Verbindung weitaus weniger toxisch ist. OTA hemmt die Proteinsynthese in vivo und in vitro, indem es die Bindung von Phenylalanin an die spezifische t-RNA behindert. Dieser Mechanismus wurde durch die Verwendung von Ochratoxinen, gebunden an andere Aminosäuren, und Hemmung der spezifischen Aminoacyl-t-RNA Synthetase bestätigt. Die International Agency for Research on Cancer (IARC) stuft OTA als mögliches menschliches Kanzerogen ein [44].

3.2.5 Physikalisch- chemische Eigenschaften

Die Löslichkeit von OTA ist in wässrigen Lösungen schlecht, kann jedoch durch Zugabe von NaHCO_3 -Lösung gesteigert werden. In Methanol ist OTA mäßig löslich. Im festen Zustand ist OTA stabil, wird aber durch starke Basen, Säuren und Oxidationsmittel zersetzt [45]. OTA ist unempfindlich gegenüber Hitze, so dass es u.a. in geröstetem Kaffee nachweisbar ist. Es zeigt in sauren und alkalischen Lösungen grüne und blaue Fluoreszenz. Die Maxima der UV-Absorption in Ethanol liegen bei 332 und 212 nm. Der Extinktionskoeffizient in Methanol, Ethanol, Benzol und Toluol bei 332 nm, liegt zwischen 5500 und 6640 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [46]. Zusätzlich besitzt OTA Säure-Base-Eigenschaften. Die pK_s -Werte liegen für die Carbonsäuregruppe bei 4,4 und für die Phenolgruppe bei 7,2-7,3 [47, 48]. Für die Analytik von OTA wird die gute Löslichkeit in basischen Lösungen ausgenutzt und eine Mischung aus wässriger NaHCO_3 -Lösung mit Methanol als Extraktionsmittel verwendet. Die Säure-Base-Eigenschaften können für spezielle Anwendungen der Festphasenextraktion ausgenutzt werden (vgl. 3.3.5)

3.2.6 Gesetzliche Regelungen

Unter Berücksichtigung der Ernährungsgewohnheiten innerhalb der Europäischen Union und des Vorkommens von OTA in diversen Lebensmitteln wurden bereits frühzeitig Höchstmengen für OTA festgelegt [49, 50, 51]. Außerdem haben einzelne Mitgliedsstaaten eigene Höchstmengen für Kaffee, Trockenfrüchte und Bier festgelegt [59].

Tabelle 3.1: Höchstgrenzen für OTA in verschiedenen Lebensmitteln

Lebensmittel	Höchstgehalt [$\mu\text{g/kg}$]
Rohe Getreidekörner	5,0
Getreideerzeugnisse	3,0
Getrocknete Weintrauben (Korinthen, Rosinen und Sultaninen)	10,0
Geröstete Kaffeebohnen/löslicher Kaffee	5,0/10,0
Wein, Getränke auf Weinbasis, Traubenmost, -saft	2,0

In der aktuellen Fassung der Verordnung (EG) 123/2005 sind noch keine Höchstwerte für grünen Kaffee, Gewürze, Kakao, Fleisch und Lakritz festgelegt worden. Der wissenschaftliche Ausschuss „Lebensmittel“ der Europäischen Union empfiehlt jedoch, alle Anstrengungen auf dem Gebiet der Forschung und der Prävention zu unternehmen, bis der OTA-Gehalt im jeweiligen Lebensmittel gemäß dem ALARA-Prinzip festgelegt werden kann. In Deutschland wurden Anfang 2004 die Mykotoxin-Verordnung und die Diätverordnung, welche vor allem Nahrung für Säuglinge und Kleinkinder betrifft, ergänzt. Da sich Säuglinge und Kleinkinder von anderen Altersgruppen sowohl bei der Nahrungsmittelaufnahme als auch im Stoffwechsel erheblich unterscheiden, sind sie einer besonderen Gefährdung durch OTA ausgesetzt. In diesem Zusammenhang wurden Höchstgrenzen im Bereich von 0,5 µg/kg für Getreidebeikost und andere diätetische Lebensmittel festgelegt [52]. Derart niedrige Grenzwerte stellen beträchtliche Ansprüche an die OTA-Analytik. Daher ist die Entwicklung neuer Verfahren unter Berücksichtigung des technischen Fortschritts notwendig. Das beinhaltet auch die Verbesserung und Optimierung bestehender Verfahren und ist das erklärte Ziel der vorliegenden Arbeit.

3.2.7 Analytik von Ochratoxin A

In der Vergangenheit wurden einige Verfahren zur Bestimmung von OTA in Lebensmitteln, Tierfutter und Körperflüssigkeiten [65] publiziert. Es existieren standardisierte Verfahren zur Bestimmung von OTA in Getreideerzeugnissen, Röstkaffee sowie Wein und Bier [53, 54, 55]. Diese basieren auf der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit anschließender Fluoreszenzdetektion (FLD). Sie lassen sich in mehrere Teilschritte wie z.B. Extraktion, clean-up/Anreicherung, Elution, Trennung sowie Detektion unterteilen. Tabelle 3.2 zeigt einen Auszug bisher veröffentlichter Verfahren

Tabelle 3.2: Methoden zur Bestimmung von OTA in unterschiedlichen Matrices

Probe	Extraktionstechnik	Clean-up	Methode
Röstkaffee [54]	Schüttelextraktion	Phenylsilan/IA	HPLC-FLD
Röstkaffee, Bier [56, 57]	Schüttelextraktion	Aminopropyl/IA,	HPLC-FLD
	Flüssigextraktion	Silica	HPLC-MS/MS
Getreideerzeugnisse [53, 58]	Flüssigextraktion	C18/Kieselgel	HPLC-FLD
	Schüttelextraktion		
Bier [59, 60]	---	IA	HPLC-FLD
Wein [61, 14]	Flüssigextraktion	IA	HPLC-FLD
		C18	HPLC-MS/MS
Lakritz [62]	Schüttelextraktion	IA	HPLC-MS/MS
Plasma [65]	Flüssigextraktion	C18 +IA	HPLC-MS/MS

In Standardverfahren werden zur Anreicherung und als clean-up vor allem Immunaффinitätssäulen (IA-Säulen) und Phenylphasen in einem Fall auch Kieselgelsäulen verwendet. Die Bestimmung des Analyten erfolgt mittels HPLC-FLD. Neben den Standardverfahren sind noch andere HPLC-FLD Methoden publiziert, in denen weitere Festphasen wie C18 verwendet werden [59, 60, 61]. Vor- und Nachteile der jeweiligen Verfahren werden in nachfolgenden Kapiteln innerhalb des Methodenvergleichs diskutiert.

Eine Alternative zur LC-FLD ist die Kopplung der HPLC mit Massenspektrometern. Dabei finden die Ionisationstechniken ESI und APCI, gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (triple stage quadrupol Geräte) vereinzelt Anwendung [14, 57]. Hier wird jedoch noch auf wenig effiziente clean-ups (Kieselgel) und ungünstige Extraktionsmittel (Toluol) zurückgegriffen [57, 63]. Eine weitere in diesem Zusammenhang stehende Variante ist die Kombination von IA-Säulen mit der LC-MS/MS sowie C18 und IA-Säulen mit LC-MS/MS [14, 64, 65, 66]. Gerade die letzte Variante ist aufgrund von zwei Festphasen innerhalb der Probenvorbereitung sehr umständlich und zeitintensiv.

Zur Bestimmung von OTA in Gewürzen, wie Chili oder Paprika existieren bislang keine Verfahren. Die Einführung von Standardverfahren ist in Vorbereitung. Bei der Bestimmung von OTA in Wein und Bier ist die Anwendung von Ionenfallen bislang nicht beschrieben.

3.3 Extraktionstechniken und clean-up

In diesem Abschnitt werden wichtige Schritte innerhalb der Probenvorbereitung, welche in dieser Arbeit angewandt wurden, erläutert. Dabei wird auf die unterschiedlichen Techniken der Extraktion von OTA aus fester und flüssiger Matrix eingegangen. Ebenso werden Alternativen, wie die Extraktion mit Umkehrphasensäulen (reversed phase/RP) oder mit IA-Säulen, diskutiert und ihre theoretischen Grundlagen erläutert.

3.3.1 Ultraschall-Extraktion

Die Ultraschall-Extraktion ist ein effektives Verfahren, um Analyten aus komplexen Matrices zu isolieren. Die Wirkung dieser Methode basiert auf dem Kavitationseffekt, welcher auch bei strömenden Flüssigkeiten auftritt. Im Ultraschallbad wird durch hochfrequente Schallwellen ein Druckabfall erzeugt, durch den Blasen in der Flüssigkeit gebildet werden. Bei einem nachfolgenden Druckanstieg brechen diese Blasen unter Ausbildung extrem hoher Drücke (500 bar) und Temperaturen (5000 K) implosionsartig zusammen. Diese extremen Bedingungen werden für einige Mikrosekunden auf die angrenzende Flüssigkeit übertragen. Die Folge ist, dass nicht miteinander mischbare Flüssigkeiten emulgieren und Feststoffe in Flüssigkeiten dispergiert werden. Diese Effekte erleichtern den Extraktionsvorgang und verkürzen die Extraktionsdauer im Vergleich zu anderen Verfahren [67]. Die Ultraschall-Extraktion wird u.a. zur Bestimmung von Umweltschadstoffen und pharmakologisch wirksamen Substanzen erfolgreich angewandt [68].

3.3.2 Beschleunigte Lösemittlextraktion (ASE®)

Die ASE® ist eine Technik zur Extraktion von festen und pastösen Proben. Dabei werden flüssige Lösungsmittel bei erhöhter Temperatur (z.B. 100° C) und Druck (z.B. 150 bar) verwendet. Während die Temperatur die Extraktionskinetik beschleunigt, hält der Druck das Lösungsmittel im flüssigen Zustand und erlaubt dadurch schnelle und einfache Extraktionen. Da hohe Temperaturen zur Zerstörung thermolabiler Verbindungen führen können, ist die Anwendung beschränkt. Gegenüber anderen Extraktionsverfahren zeichnet sich die ASE® durch einen geringen Lösungsmittelverbrauch, kurze Extraktionszeiten, sehr gute Ausbeuten und einen hohen Grad der Automation aus. Damit ist die ASE® eine Alternative zur Schüttel- und Ultraschallextraktion. Die ASE® wird in der Umwelt- und Lebensmittelanalytik u.a. für Herbizide, PCB (polychlorierte Biphenyle) und Mykotoxine (Zearalenon) erfolgreich angewandt [69].

3.3.3 Festphasenextraktion (SPE)

Die SPE ist ein Extraktionsprozess, der zwischen einer flüssigen und festen Phase stattfindet. Der Trennmechanismus ist analog dem der HPLC und wird hier deshalb nicht weiter erläutert. Die SPE hat in den letzten Jahren, vor allem auf dem Gebiet der Wasser- und Rückstandsanalytik, an Bedeutung gewonnen. Für die SPE werden Glas- oder Kunststoffkartuschen eingesetzt, die 30-1000 mg eines Adsorbens enthalten. Als Adsorbens werden u.a. Aluminiumoxid, Ionentauscher, modifiziertes Kieselgel oder andere, aus der HPLC bekannte Materialien eingesetzt. Das Adsorbens wird im ersten Schritt gewaschen und konditioniert, d.h. es werden aus dem Herstellungsprozess stammende Verunreinigungen entfernt und die Festphase aktiviert (A). Anschließend wird die zu extrahierende Flüssigkeit mit einer Fließgeschwindigkeit von 1-5 mL/min durch die Kartusche gesaugt (B). Nun folgen eventuelle Waschschrte (C) und die abschließende Elution der Analyten mit einer geringen Menge an geeignetem Lösungsmittel (D). Das Prinzip ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

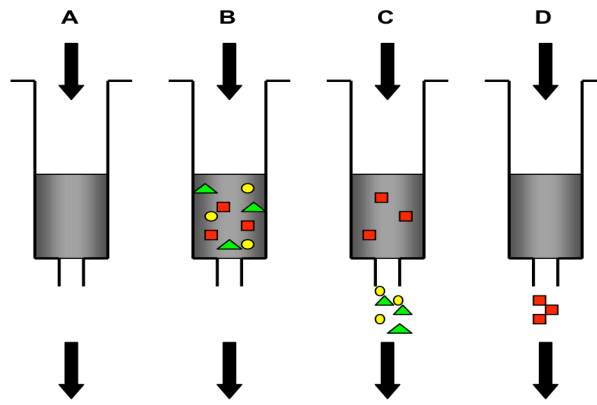


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Festphasenextraktion

Der Vorteil dieser Technik liegt in der Anreicherung gering konzentrierter Analyten. Nachteilig ist aber, dass außer dem Analyten auch Matrixkomponenten gleicher Affinität zur Festphase extrahiert und angereichert werden.

3.3.4 Extraktion und clean-up mit Immunaffinitätssäulen

Das clean-up an IA-Säulen stellt ein hoch spezifisches Verfahren zur Anreicherung von Analyten aus komplexen Matrices dar. Dabei handelt es sich um Festphasenkartuschen, gefüllt mit Gelpartikeln, an die monoklonale Antikörper gebunden sind. Das Prinzip ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Zunächst wird die Säule gewaschen, um Verunreinigungen zu entfernen (A). Dann folgt das Auftragen der Probe (B). Basierend auf einer Antigen/Antikörper Reaktion wird der Analyt (Antigen) hochspezifisch aus einer Probenlösung entfernt. Sofern keine Kreuzreaktivitäten auftreten, passieren alle anderen Substanzen die Säule (C). Anschließende Elution mit einer alkoholischen Desorptionslösung denaturiert die Antikörper und setzt den gebundenen Analyten frei (D). Dieser kann nun mittels DC, HPLC oder auch ELISA bestimmt werden.

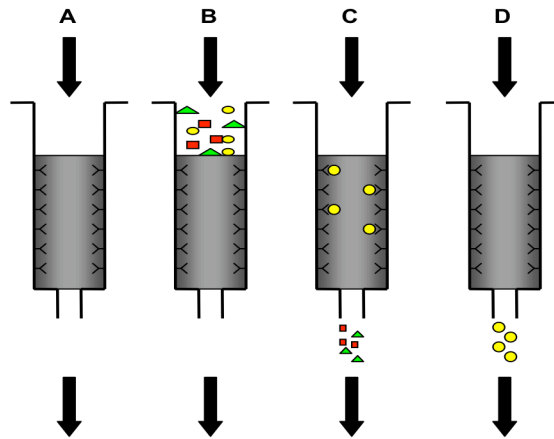


Abbildung 3.5: Prinzip einer Immunaффinitätssäule

Auf diese Art und Weise können geringste Rückstände wie Fungizide oder Mykotoxine aus Lebensmitteln, Seren und anderen Matrices isoliert werden [70, 71]. Die hohe Spezifität der monoklonalen Antikörper bringt jedoch auch Nachteile mit sich. So können nur selten mehrere Toxine nebeneinander bestimmt werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass Metabolite die Säule passieren und nicht detektiert werden, ist groß. Ebenso treten falsch positive Ergebnisse aufgrund von Kreuzreaktivitäten und anschließenden unspezifischen Detektionsverfahren auf [72]. Weiterhin sind Immunaффinitätssäulen kostenintensiv und nicht wieder verwendbar.

3.3.5 Kombiniertes Umkehrphasen/Anionenaustauscher clean-up

Für dieses Extraktionsverfahren wird ein Adsorbens, bestehend aus einem Copolymer (Divinylbenzol-co-N-vinylpyrrolidon) an dessen Oberfläche quarternäre Amino-Gruppen gebunden sind, benutzt. Auf diese Art lassen sich RP-Eigenschaften mit starken Anionenaustausch-Wechselwirkungen verknüpfen (vgl. Abbildung 3.6). Analog der Festphasenextraktion ist dieses Material in Glas- oder Kunststoffkartuschen eingebracht. Während die Amino-Gruppen selektiv Anionen binden (A), weist das Copolymer Affinitäten zu „unpolaren“ Komponenten, in dem Fall über π - π -Wechselwirkungen (B) auf. Durch geeignete Auswahl des pH-Wertes, der Polarität der Probelösung und der Waschlösungen, lassen sich im Vergleich zu reinen RP-Phasen wesentlich bessere clean-up-Effekte erzielen.

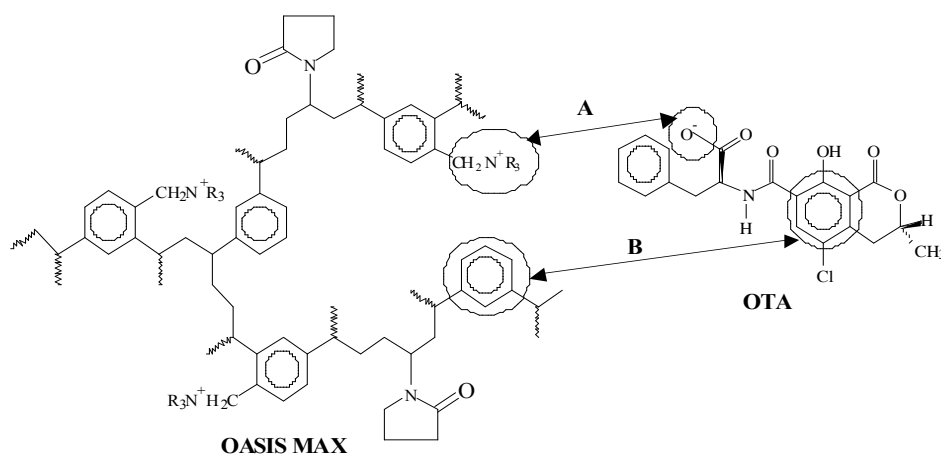


Abbildung 3.6: Mechanismus des kombinierten Anionentauscher/RP clean-up

Die Handhabung dieser Säulen ist sehr einfach. Sie können im Gegensatz zu RP- und Immunaффinitätsphasen trocken laufen, ohne die Reproduzierbarkeit oder Wiederfindung zu beeinflussen. Sie sind somit wesentlich robuster als herkömmliche Phasen, was im Laboralltag von Vorteil ist.

3.4 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Unter Chromatographie werden physikalische Verfahren zusammengefasst, bei denen eine Stofftrennung zwischen einer stationären und einer mobilen Phase erfolgt. Als Flüssigchromatographie bezeichnet man Analysetechniken mit flüssiger mobiler Phase. Dazu zählen die Papier-, Dünnschicht- und Säulenchromatographie. Die Säulenchromatographie wird überwiegend als Hochdruck-Flüssig-Chromatographie durchgeführt. Je nach Art der Wechselwirkung zwischen Analyt, stationärer und mobiler Phase unterscheidet man verschiedene Trennmechanismen wie Verteilungs-, Adsorptions- und Ionenaustauschchromatographie. In dieser Arbeit wurde ausschließlich RP-HPLC (Verteilungschromatographie) angewandt. Bei dieser Technik werden unpolare Derivate des Kieselgels als stationäre Phase verwendet. Als mobile Phase dienen unter anderem Acetonitril, Methanol und Wasser, die unter Berücksichtigung der Problematik mit Additiven versetzt werden. Das können sowohl Basen, Säuren oder auch Puffer sein.

Inzwischen zählt die Umkehrphasen-HPLC zu den wichtigsten Verfahren überhaupt und wird

in sämtlichen Bereichen der Analytik eingesetzt. Allein im pharmazeutischen Bereich werden über 80 % der Analysen durch HPLC mit ihren Kopplungsmöglichkeiten abgedeckt.

Die theoretischen Grundlagen der Trennmechanismen, Säulenmaterialien, Fließmittelzusammensetzungen, Elution sind in zahlreichen Lehrbüchern erläutert und werden an dieser Stelle nicht näher besprochen [73, 74, 75, 76].

3.4.1 Detektionstechniken

In der HPLC finden zahlreiche Detektoren wie der Ultraviolett- (UV-), Diodenarray- (DAD-), Fluoreszenz- (FLD) und der Brechungsindex-Detektor (RI-) Anwendung. Bei allen Detektoren wird die mobile Phase durch eine Flusszelle geleitet, in welcher die Änderung einer chemischen oder physikalischen Eigenschaft gemessen wird. Diese Änderung wird als elektrisches Signal an eine Auswerteeinheit geleitet. Die Detektoren unterscheiden sich in der Selektivität, der Empfindlichkeit und im linearen Bereich [74]. Neben den genannten Detektionstechniken ist die Kopplung der HPLC mit der Massenspektrometrie zu nennen. Da diese Technik in dieser Arbeit ausschließlich innerhalb der Methodenentwicklung angewandt wurde, wird diese ausführlich in den nächsten Kapiteln besprochen (vgl. 3.5.3).

3.5 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) ist ein Verfahren zur Bestimmung freier Ionen im Hochvakuum. Jedes Massenspektrometer, unabhängig von der Vielzahl technischer Lösungen, besteht aus einer Ionenquelle, in der ein Strahl gasförmiger Ionen erzeugt wird, einem Massenanalysator, der die Ionen nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) trennt, sowie einem Detektor, welcher den Ionenstrom registriert. Dieser kann unter anderem ein Sekundär-Elektronen-Vervielfacher (SEV) oder Photomultiplier sein [77]. In den folgenden Kapiteln werden sowohl Ionisationstechniken als auch Massenanalysatoren, die in dieser Arbeit angewandt wurden, näher erläutert.

3.5.1 Ionisationstechniken

Im Gegensatz zu den klassischen Ionisationsverfahren (z.B. Elektronenstoßionisation), bei denen ein Vakuum in der Ionenquelle erforderlich ist, sind in den letzten Jahren Verfahren entwickelt worden, bei denen die Ionisation unter Atmosphärendruck (API) erfolgt. Dazu gehört die Elektrospray Ionisation (ESI), welche in den vergangenen Jahren an Bedeutung gewonnen hat.

Das Phänomen „Elektrospray“ wurde bereits frühzeitig entdeckt, jedoch erst nach den Arbeiten von Fenn et. al. in die Massenspektrometrie involviert [78, 79, 80]. Bei der ESI-MS werden die in Lösung vorliegenden Analyten unter Einfluss einer Hochspannung ($\approx 1\text{-}6\text{ kV}$) im Stickstoffstrom versprüht, wodurch sich zunächst kleine geladene Tröpfchen bilden (vgl. Abbildung 3.7)

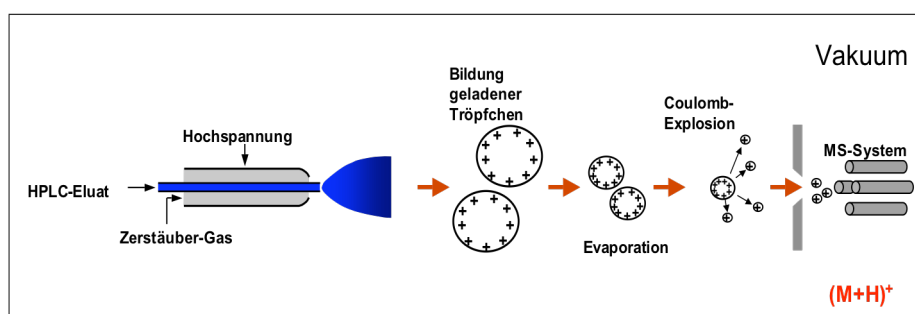


Abbildung 3.7: Der ESI-Prozess

Diese nehmen durch Verdampfung des Lösungsmittels im Durchmesser ab, während die Oberflächenladung zunimmt. Wird das Rayleigh-Limit erreicht, zerfallen die Tröpfchen wegen der Abstoßungskräfte zwischen gleichnamigen Ladungen in Coulomb-Explosionen zu kleineren Tröpfchen [81]. Der Prozess wiederholt sich, bis aus den Tröpfchen Ionen in die Gasphase übertreten. Für dieses Phänomen werden momentan zwei Modellvorstellungen diskutiert. Das erste ist das Modell des geladenen Rückstands (Charge Residue Modell, CRM). In diesem Fall geht man von der Entstehung winziger Tröpfchen aus, die nur noch ein Molekülion enthalten. Dieses wird durch den Stickstoffstrom desolvatisiert und geht in die Gasphase über [82, 83]. Das zweite ist das Ionenemissionsmodell (Ion Evaporation Model, IEM). Hier gehen Ionen bereits aus größeren Tropfen hoher Ladung in die Gasphase über [84]. Beide Theorien lassen sich auf experimentelle Daten übertragen.

Auf Grund geringer Überschussenergien bei der Ionisation kann man die ESI zu den „sanften“ Ionisationstechniken zählen, so dass Moleküle ohne nachfolgende Fragmentierung detektiert werden können. Bei der Ionisierung entstehen die bereits genannten Quasi-Molekülionen, die je nach Polarität durch Anlagerung $(M+H)^+$ oder Abstraktion $(M-H)^-$ eines Protons gebildet werden. Die Bildung von Addukten (Cluster) durch Anlagerung im Lösungsmittel vorhandener Ionen ist ebenfalls weit verbreitet. Je nach verwendetem Lösungsmittel können auf diese Art Natriumaddukte (in Methanol) oder Kaliumaddukte (in Acetonitril) entstehen. Im negativen Modus können Chloridaddukte auftreten, die durch das spezifische Isotopenmuster des Chlors schnell erkannt werden. Grundsätzlich gilt, dass die Adduktbildung von verschiedenen Parametern wie Lösungsmittel oder Trockengastemperatur abhängt und mit der Konzentration der Probelösung zunimmt. Analyten größeren Molekulargewichts (> 1.000 Da) bilden eine Reihe mehrfach geladener Ionen, aus deren Verteilung sehr genaue Molekulargewichtsprofile berechnet werden können. Aus diesen Gründen ist die ESI für die Analytik von Proteinen von Bedeutung.

Wie bereits erwähnt, findet die Ionisation unter Atmosphärendruck in der Ionenquelle statt, während für die Massenanalyse ein Hochvakuum erforderlich ist. Diese Tatsache muß bei der Entwicklung von Massenspektrometern berücksichtigt werden. Die Schnittstelle zwischen Ionenquelle und Analysator wird als Interface und der Weg der Ionen als Ionenoptik bezeichnet. Die technischen Anforderungen dafür sind unterschiedlich realisiert. Beispielhaft wird an dieser Stelle die Ionisation und der Transfer von Molekülen zum Analysator im MS-Detektor XCT 1100 der Firma Agilent vorgestellt [85].

Über eine Kapillare werden gelöste Analytmoleküle in die Sprühkammer (engl. Spray Chamber) geleitet. Diese Kapillare ist mit einem Zerstäuber (engl. Nebulizer) verbunden, welcher durch Vermischen des Eluenten mit Stickstoff ein Aerosol erzeugt. Die Spitze des Zerstäubers liegt im Spannungsfeld einer semi-zylindrischen Elektrode (1-6 kV; engl. mesh electrode), und ist orthogonal zur Transferkapillare angebracht. Aufgrund der Potentialdifferenz zwischen Zerstäuber (Bezugspotential) und Elektrode entsteht ein starkes elektrisches Feld, welches die Aufladung der Tröpfchen im Aerosol bewirkt. Durch Anlegen einer Zugspannung werden diese geladenen Tröpfchen in Richtung der Transferkapillare, durch einen „Vorhang“ heißen Stickstoffstroms gezogen. Der Stickstoff läßt die Tröpfchen schrumpfen und entfernt ungeladene Matrixbestandteile. Aufgrund des geringen Durchmessers der Transferkapillare kann dahinter ein Vakuum aufgebaut werden. In der nachfolgenden Ionenoptik werden die Ionen weiter fokussiert, bevor sie in den Massenanalysator gelangen. Während die ESI üblicherweise mit Flussraten im Bereich 1-

1000 $\mu\text{L}/\text{min}$ arbeitet (sog. Mikrospray), wurde die Variante des Nanospray entwickelt, um mit Flussraten im nL/min -Bereich zu operieren [86].

Eine weitere Möglichkeit zur Ionisation von Analytmolekülen unter Atmosphärendruck ist die APCI (atmospheric pressure chemical ionisation). Im Vergleich zur ESI wird diese Technik überwiegend für weniger polare Moleküle geringerer Größe (50-1000 Da), u.a in der Rückstandsanalytik, eingesetzt [87, 88].

3.5.2 Massenanalysatoren

Zu den am weitesten verbreiteten Analysatoren zählt aufgrund der einfachen und kompakten Konstruktion der Quadrupol. Dieser ist aus vier konzentrischen, parallel zueinander angeordneten Stabelektroden, die auf einem Kreis um die Flugachse der Ionen angeordnet sind, aufgebaut. An jeweils gegenüberliegende Stäbe wird eine Gleichspannung gleicher Polarität angeschlossen. Zusätzlich liegen hochfrequente, phasenverschobene Wechselspannungspotentiale an jedem Stäbepaar. Durch Anlegen einer geringen Beschleunigungsspannung werden die Ionen aus der Ionenquelle in den Raum zwischen den Stäben gezogen. Hier bewegen sie sich auf spiralförmig gewundenen Bahnen, deren Funktion vom Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) der Ionen sowie der Intensität des Wechselspannungspotentials abhängig ist. Durch Variation der Wechselspannungspotentiale läßt sich der Massenbereich eingrenzen.

Eine Weiterentwicklung des Quadrupols ist die Paul'sche Ionenfalle. Diese besteht aus einer Ringelektrode, die zwischen zwei Endkappenelektroden angebracht ist. Eine derartige Anordnung zeigt ein dreidimensionales hyperbolisches Profil und kann als in sich gebogener, an den Enden verbundener Quadrupol betrachtet werden. Zentrische Öffnungen an den Endkappen ermöglichen es Ionen, in die Falle ein- und auszutreten. Wird eine Wechselspannung an die Ringelektrode angelegt, so entsteht eine Potentialdifferenz zwischen dieser und den Endkappen. Das führt zur Ausbildung eines dreidimensionalen Quadrupolfeldes, in dem Ionen stabilisiert werden können. Durch Erhöhung der Wechselspannungs-Amplitude werden einige Ionen instabil und aus der Falle geschleust. Der austretende Ionenstrom wird detektiert. Die Ionenfalle arbeitet diskontinuierlich. Es werden ständig Zyklen beginnend mit der Füllung der Falle bis zur Massenanalyse durchlaufen. Die Dauer der Zyklen liegt im Bereich von Millisekunden (ms), so dass die Ionenfalle auch zur

online-Detektion verwendet werden kann. Ionenfallen können zur Analyse eines weiten Massenbereiches (Full Scan Modus) oder einzelner Massen (Single Ion Monitoring) betrieben werden. Ebenso ist die Ionenfalle zur Tandemmassenspektroskopie einsetzbar. Damit ist es möglich, Sekundärfragmentierungen zu beobachten und Ionen gleicher Masse aber unterschiedlicher Struktur zu unterscheiden.

Diese Technik ist mit einem Triple Stage Quadrupol Gerät (TSQ) ebenfalls durchführbar. In diesem Fall sind drei Quadrupole (Q_1 , Q_2 , Q_3) hintereinander angeordnet. Q_1 wird im Full Scan Modus als Massenfilter eingesetzt. Q_2 stellt die so genannte Kollisionszelle dar. Hier prallen die Ionen auf Gasmoleküle (Stickstoff, Argon), werden abgebremst und fragmentiert. Q_3 dient zum scannen der entstandenen Fragmente (Tochterionen, engl. daughter ion).

3.5.3 LC-MS/MS Kopplung

Durch die Entwicklung der ESI sowie der APCI (vgl. 3.5.1) waren die fundamentalen Probleme bei der Kopplung der Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie, vor allem die erhebliche Diskrepanz zwischen großen Lösungsmittelvolumen und den erforderlichen Vakuumbedingungen, überwunden. Die Grundlage zur Kopplung zweier unabhängiger, für sich bereits seit Jahrzehnten etablierter Techniken, war gelegt.

Im Vergleich zu klassischen LC-Detektoren (UV, FLD) lässt sich mittels MS-Detektion das „Analytische Fenster“ um eine weitere Dimension, nämlich der Trennung nach dem Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z), erweitern. Der MS-Detektor ist in der Lage, Substanzen mit gleicher Retentionszeit zu unterscheiden, sofern sie nicht die gleiche Masse besitzen [89]. Tritt dies ein, besteht die Möglichkeit, derartige Zweifelsfälle mit Hilfe der Tandemmassenspektrometrie zu lösen. Die Tandemmassenspektrometrie zeigt auch dann ihre Stärken, wenn für bestimmte Anforderungen viele Identifizierungspunkte erforderlich sind [90]. Aufgrund der Entwicklung immer leistungsfähigerer Geräte, lassen sich mittels LC-MS/MS neben der Quantifizierung von Analyten in Matrixproben auch Strukturaufklärung von organischen Substanzen routinemäßig durchführen. Obwohl die MS/MS ein sehr spezifisches Detektionsverfahren darstellt, darf die HPLC, gerade bei komplexen Matrices, nicht nur als „Einlasssystem“ in der quantitativen Rückstandsanalytik verstanden werden. Vor allem nicht abgetrennte Matrix wirkt sich neben der Ionisierbarkeit und der chemischen Struktur des Analyten stark auf die Nachweisgrenze oder Wiederfindung aus.

4 Entwicklung von Analyseverfahren zur Bestimmung von OTA in Lebensmitteln

Im folgenden Kapitel wird das Ziel dieser Arbeit, die Entwicklung neuer Analysenverfahren zur Bestimmung von OTA in Lebensmitteln vorgestellt und ausführlich diskutiert. Da für die ausgewählten Lebensmittel Höchstwerte existieren oder momentan diskutiert werden, müssen leistungsstarke Verfahren bereitgestellt werden (vgl. 3.2.6). Das Augenmerk liegt in diesem Zusammenhang auf der Entwicklung neuer clean-up-Verfahren sowie der Anwendung der Tandemmassenspektrometrie als Detektionstechnik. Diese Aspekte werden in diesem Kapitel vorgestellt und ausführlich diskutiert. Weiterhin werden die vorgestellten Verfahren mit anderen clean-ups, wie dem mit IA- oder RP-Säulen und Detektionstechniken, wie der Fluoreszenzdetektion, verglichen. In diesem Zusammenhang werden zur Bewertung der vorgestellten Verfahren unter anderem Präzisionsdaten vorhandener Standardvorschriften herangezogen. Abschließend werden die entwickelten Verfahren validiert und die wichtigsten Verfahrensmerkmale wie z.B. die Wiederfindung und die Nachweisgrenze bestimmt. Anhand der Stabilitäts- und Homogenitätsuntersuchungen wird die Messunsicherheit der Verfahren eingegrenzt.

4.1 OTA Stammlösungen

4.1.1 Herstellung

In Standardverfahren werden OTA-Konzentrationen photometrisch bestimmt [53, 54]. Dazu wird zunächst das Absorptionsmaximum (A_{\max}) der eingesetzten OTA-Lösung bei einer vorgegebenen Wellenlänge ermittelt (z.B. 330 nm in Methanol). Unter Berücksichtigung des Extinktionskoeffizienten (ϵ) des jeweiligen Lösungsmittels, der molaren Masse des OTA (M) und der Schichtdicke der Küvette (δ), kann nach Umstellung des Lambert-Beer'schen-Gesetzes der OTA-Gehalt (ρ) berechnet werden (vgl. Gleichung 4.1).

$$\rho_{OTA}[\mu\text{g} / \text{mL}] = \frac{A_{\text{max}} \times M \times 1000}{\varepsilon \times \delta}$$

Gleichung 4.1: Berechnung der OTA-Konzentration

Eine Übersicht über Extinktionskoeffizienten von OTA in verschiedenen Lösungsmitteln ist veröffentlicht [46]. Begründet wird dieses Vorgehen durch die geringen Einwaagen (≈ 1 mg), die Genauigkeit der Photometrie sowie elektrostatische und hygroskopische Eigenschaften des OTA, welche das Einwiegen erschweren. Diese Eigenschaften konnten jedoch nicht beobachtet werden. Deshalb wurden innerhalb dieser Arbeit sämtliche OTA-Stammlösungen gravimetrisch hergestellt. Dazu wurde eine Mikrowaage eingesetzt. Die Messunsicherheit der verwendeten Mikrowaage (Wägebereich 0-2,1 g) wurde mit 0,121% für Einwaagen im 1 mg Bereich berechnet. Da Gravimetrie eine Primärmethode darstellt, sollte diese der photometrischen Bestimmung vorgezogen werden [91]. Um beide Verfahren vergleichen zu können, wurde die Konzentration der OTA-Stammlösungen, sowohl gravimetrisch als auch photometrisch kontrolliert. Die Konzentration der gravimetrisch hergestellten Stammlösungen wurde unter Berücksichtigung der Dichte des Lösungsmittels (Methanol) in $\mu\text{g/mL}$ umgerechnet.

Tabelle 4.1: Vergleich zwischen Gravimetrie und Photometrie

Probe	Gravimetrie [$\mu\text{g/mL}$]	Photometrie [$\mu\text{g/mL}$]	Abweichung [%]
1	9,917	7,410	25
2	13,89	12,12	13
3	19,74	19,95	1

Wie aus Tabelle 4.1 ersichtlich, weicht die Photometrie erheblich von der Gravimetrie ab. Da die Wiederholpräzision einer photometrischen Messung unter 1% liegt, liegt die Abweichung zur Gravimetrie bei der Bestimmung der Extinktionskoeffizienten und den in diesem Zusammenhang verwendeten Standards. Um den Beitrag zur Methodenunsicherheit möglichst gering zu halten, sollte die gravimetrische Bestimmung der photometrischen vorgezogen werden.

4.1.2 Stabilität von OTA-Standardlösungen

Die in 4.1.1 beschriebenen methanolischen Stammlösungen wurden bei 4° C gelagert und nicht länger als zwei Monate eingesetzt. Es wurden jedoch auch längere Haltbarkeiten dokumentiert [57].

Im Routinebetrieb werden die methanolischen Stammlösungen mit der mobilen Phase des HPLC-Fließmittels (MeOH/H₂O/Eisessig; 70/30/1,5) verdünnt, um für die externe Kalibrierung eingesetzt werden zu können (Kalibrierstandards). In Vorversuchen wurde die Stabilität dieser Lösungen überprüft. Die Lagerzeit betrug dabei 60 Tage bei einer Temperatur von 20° C. Es konnte ein Abbau des OTA und die Bildung einer neuen Verbindung festgestellt werden. Die Masse des entstandenen Abbauproduktes wurde durch LC-MS/MS Kopplung mit $m/z = 360$ für das protonierte Molekölion ($[M+H]^+$) bestimmt. Bei dieser Verbindung handelt es sich vermutlich um die decarboxylierte Form des OTA (vgl. Abbildung 4.2). Unterstützt wird diese Vermutung durch die höhere Retentionszeit dieser Verbindung in der LC-MS/MS-Analyse an einer C18-Säule (vgl. Abbildung 4.1).

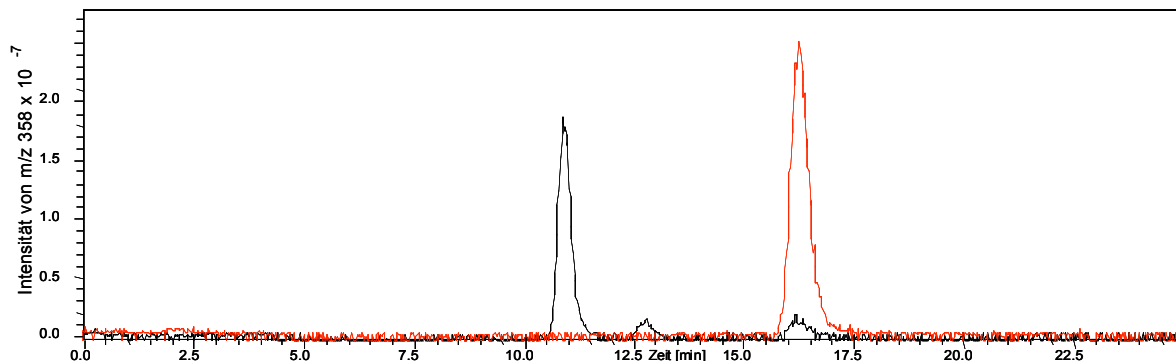


Abbildung 4.1: EIC von $[M+H]^+ = 404$ (schwarz) und $[M+H]^+ = 360$ (rot)

Durch den Verlust der polaren Carboxylgruppe wird die decarboxylierte Form stärker retardiert, was wiederum eine höhere Retentionszeit bewirkt. Es handelt sich hier vermutlich um eine Abspaltung von Kohlendioxid, welche folgendermaßen abläuft:

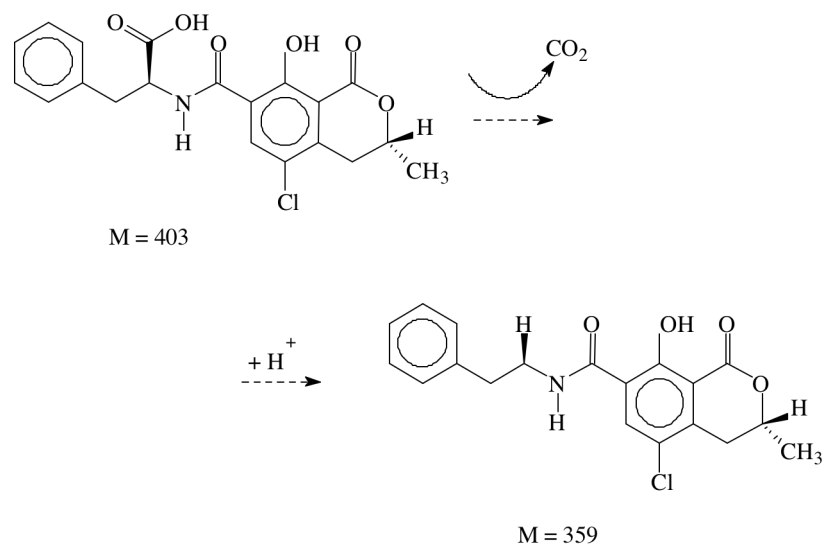


Abbildung 4.2: Decarboxylierung von OTA

Diese Verbindung wurde für Kernresonanzmessungen von OTA und analogen Verbindungen synthetisiert [92]. Kenntnisse über das Vorkommen der decarboxylierten Form in Lebensmitteln existieren bislang nicht.

Um weitere Aussagen über die Haltbarkeit von Kalibrierstandards treffen zu können, wurde die Stabilität mehrerer Kalibrierreihen unterschiedlichen Alters untersucht. In diesem Fall wurden die Lösungen im Kühlschrank bei 4° C gelagert. Im Gegensatz zur halbquantitativen Bestimmung des OTA im Vorversuch, wurde die Stabilität nun durch quantitative Bestimmung wie folgt ermittelt:

Zunächst wurde die Linearität der einzelnen Kalibrierreihen bestimmt. Anschließend wurde unter Annahme einer willkürlich gewählten Peakfläche der hypothetische OTA-Gehalt einer Probe berechnet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 4.2: OTA-Abbau in Standardlösungen (n = 4-6)

Alter [d]	Lineare Regression	OTA Gehalt (Peakintensität 100.000 counts)
2	$Y = 70047x + 59428$	13,4 µg/kg
15	$Y = 66242x + 98937$	13,6 µg/kg
30	$Y = 76155x - 61250$	13,9 µg/kg

Wie aus Tabelle 4.2 ersichtlich, liegen die hypothetischen OTA-Gehalte zwischen 13,4 und 13,9 µg/kg. Die relativen Standardabweichungen betragen 1,5% und liegen im Rahmen der Messunsicherheit des LC-MS/MS-Systems. Demnach können Kalibrierlösungen 30 Tage bei 4° C gelagert werden. Für die Laborroutine wurde ein Sicherheitsfaktor berücksichtigt und sämtliche Kalibrierlösungen nicht länger als 1 Woche verwendet.

Die Stabilität von OTA-Stammlösungen wurde zusätzlich mit der Kernresonanzspektroskopie (^1H -NMR) überprüft. Diese Methode stellt eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der Stabilität von organischen Substanzen dar. Durch zeitlich abhängige Messungen ein und derselben Probe lassen sich intramolekulare Veränderungen und mögliche Abbauprodukte feststellen.

In dieser Arbeit wurden die Stabilität einer OTA-Stammlösung, die in einem verschmolzenen NMR-Röhrchen, zunächst im Kühlschrank und dann bei Raumtemperatur gelagert wurde, über einen Zeitraum von zwei Monaten überprüft. Um eine Vergleichbarkeit mit OTA-Standards zu gewährleisten, wurde Methanol- d_4 als Lösungsmittel gewählt. Die Messungen wurden unter reproduzierbaren Bedingungen und Parametern durchgeführt, so dass die Spektren im Rahmen der Wiederholpräzision vergleichbar sind.

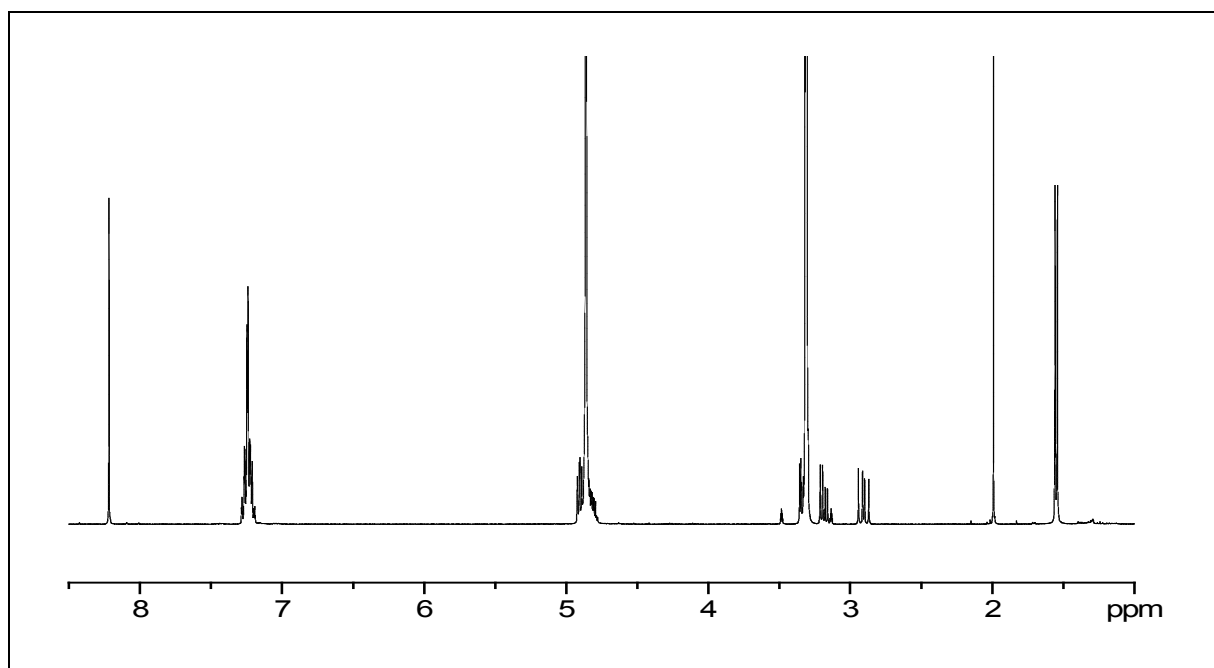


Abbildung 4.3: ^1H -NMR von OTA in Methanol- d_4

Die chemische Verschiebung wurde auf das Lösungsmittelsignal von Methanol-d₄ (3,31 ppm) skaliert. Die Anzahl der Protonen wurden durch Integration der jeweiligen Signale und ihrem Verhältnis zueinander ermittelt. Diese sowie die Kopplungskonstanten sind in Tabelle 4.3 dargestellt. In Klammern sind die jeweiligen Literaturwerte gegenübergestellt.

Tabelle 4.3: Auswertung des ¹H-NMR von OTA; s (Singulett), d (Duplett), m (Multipllett), dd (Duplett vom Duplett)

Peaks [ppm]	Anzahl der Protonen	Signal	Zuordnung	Kopplungskonstante [Hz]
1,55 (1,59)	3 (3)	d (d)	-CH ₃	6,3 (6,3)
2,90 (2,85)	1 (1)	dd (dd)	-CH	17,4; 11,6 (17,5; 11,5)
3,18 (3,22)	1 (1)	dd (dd)	-CH	13,9; 6,9 (14,1; 7,4)
ca. 3,1-3,4 (3,28)	(1)	(dd)	-CH	(17,5; 3,3)
3,32 (3,36)	1 (1)	dd (dd)	-CH	13,7; 5,4 (14,1; 5,3)
4,77-4,85 (4,75)	1 (1)	m (m)	-CH	
4,90 (5,04)	1 (1)	dd (m)	-CH	6,9; 5,3
7,18-7,29 (7,2-7,4)	5 (5)	m (m)	-CH	
8,22 (8,42)	1 (1)	s (s)	-CH	
(8,48)	(1)	(d)	-CH	(6,7)
(12,76)	(1)	(s)	-CH	

Die Signale zwischen 3,1-3,4 ppm sind nicht vollständig auswertbar, da sie vom Lösungsmittelsignal partiell überlagert sind. Es müsste sich jeweils um Dupletts von Dupletts (dd) handeln. Bei dem Signal um 2 ppm handelt es sich um eine Verschmutzung aus dem Lösungsmittel. Alle weiteren Signale stimmen mit Literaturangaben überein [92, 93].

Innerhalb von zwei Monaten konnten keine intramolekularen Veränderungen festgestellt werden, so dass für diesen Zeitraum eine Stabilität der Stammlösung gewährleistet werden kann. Desweiteren konnte durch dieses Experiment die Reinheit des Standards geprüft werden, da die Spektren auch nach zwei Monaten frei von Verunreinigungen und Abbauprodukten sind.

4.2 Optimierung der HPLC-MS/MS Parameter

4.2.1 Optimierung der HPLC-Parameter

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden folgende HPLC-Parameter variiert und untersucht:

- Säulenmaterialien (C18 vs. Polymerphase)
- Fließmittelzusammensetzung
- Fließmitteladditive (Trifluoressigsäure/TFA, Essigsäure/HAc, Triethylamin/TEA)
- Säulendurchmesser (4,6 mm, 3 mm, 2 mm)
- Säulentemperatur
- Injektionsvolumen

Es wurden zunächst OTA-Standards hoher Konzentration eingesetzt und mittels UV bei 330 nm detektiert. Die erhaltenen Daten wurden unter Berücksichtigung folgender Kriterien ausgewertet:

- Retentionszeit
- Peaksymmetrie
- Peakbreite
- Peakhöhe

In Vorversuchen wurde festgestellt, dass unter Berücksichtigung der genannten Kriterien die C18-Phase einer Polymerphase überlegen ist. Deshalb wurden alle anderen HPLC-Parameter auf die C18-Phase optimiert. Bei der Auswahl der Fließmittelzusammensetzung wurde auf Methanol zurückgegriffen, da die Ionenausbeute in methanolischen Fließmitteln oftmals am größten ist. Um die Retention am Säulenmaterial zu verbessern, wurde dem Methanol systematisch Wasser zugefügt und die optimale Mischung ermittelt.

Ein weiterer, vor allem in der Spurenanalytik wichtiger Faktor, ist die Nachweisgrenze. Diese wird bei Verwendung von HPLC-Säulen geringen Durchmessers gesteigert, da die Peaks schmaler und vor allem höher werden. Dementsprechend lieferten HPLC-Säulen mit 2 mm Innendurchmesser die besten Ergebnisse. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass saure Additive (HAc und TFA) günstiger für die Chromatographie sind als basische (TEA), was auf

die Säureeigenschaften ($pK_s = 4,4$) des OTA zurückzuführen ist. Im sauren Milieu liegt OTA undissoziiert vor. Die Retention an unpolaren C18-Phasen ist gewährleistet, so dass symmetrische Peaks mit ausreichendem Abstand von der Totzeit erhalten werden. Diese sollte mindestens um den Faktor 2,5 höher sein als die Totzeit [94]. Im Gegensatz dazu war im basischen Milieu eine starke Peakverbreiterung und schlechte Retention zu erkennen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Säurekonzentration (HAc) im Fließmittel starken Einfluss auf die Retention hat. So konnte durch Erhöhung des Säureanteils von 0,1% auf 1,5% die Retentionszeit halbiert werden. Die optimierten LC-Parameter sind in Tabelle 4.4 aufgeführt. Anschließend mußten diese auf die MS/MS-Anforderungen abgestimmt werden.

Tabelle 4.4: HPLC-Parameter

Eluent	Methanol/Wasser/Eisessig; 70/30/1,5
Säule	Inertsil ODS 3, 250 x 2 mm, 5 μ m; VDS Optilab, Berlin
Säulentemperatur	45 ° C
Flussrate	0,25 mL/min
Injektionsvolumen	20 μ L

4.2.2 Optimierung der massenspektrometrischen Parameter (Ionenfalle)

Die genannten Parameter wurden für die Kopplung einer HPLC mit dem MSD 1100 XCT Ion Trap-System optimiert. Dabei wurde mit einer Spritzenpumpe und unter Anwendung der Fließinjektionsanalyse (FIA) gearbeitet. Die Kapillarspannung wurde bei positiver Polarität auf 3.5 kV, der Trockengasfluss auf 10 L/min und der Zerstäubergasdruck auf 30 psi eingestellt. Um die Tochter-Ionen des OTA zu bestimmen, wurde das protonierte Molekül ($[M+H]^+$) mit m/z 404 isoliert. Anschließend wurde Helium in die Falle eingeleitet und die Kollision zwischen Analyten und Helium induziert. Die Fragmente wurden innerhalb eines Scanbereichs von 200-500 m/z detektiert. Abbildung 4.4 zeigt das intensivste Tochter-Ion mit einem m/z 358, welches durch die Abspaltung neutraler Ameisensäure entsteht ($[M+H-HCOOH]^+$). Desweiteren existieren Tochter-Ionen geringerer Intensität, welche durch die Abspaltung von Wasser ($[M+H-H_2O]^+$; m/z 386), Ameisensäure, Ammoniak ($[M+H-HCOOH-NH_3]^+$; m/z 341) sowie den Verlust von Phenylalanin ($[M+H-Phenylalanin]^+$;

m/z 239) entstehen. Die postulierte Bildung von m/z 341 erfordert zwar massive Umlagerungen innerhalb des Moleküls, kann aber auf diese Art und Weise am plausibelsten erklärt werden.

Sämtliche OTA-Analysen wurden im MRM-Modus durch Beobachtung des Zerfalls M^3 : 404→358 durchgeführt. Die anderen Übergänge (z.B. M^3 : 404→341) können als sogenannte „Qualifier“ für das Erreichen einer Mindestanzahl an Identifizierungspunkten herangezogen werden. Wie aus Abbildung 4.4 ersichtlich, ist die Intensität dieser Tochter-Ionen wesentlich geringer, was auch zu höheren Nachweisgrenzen führt.

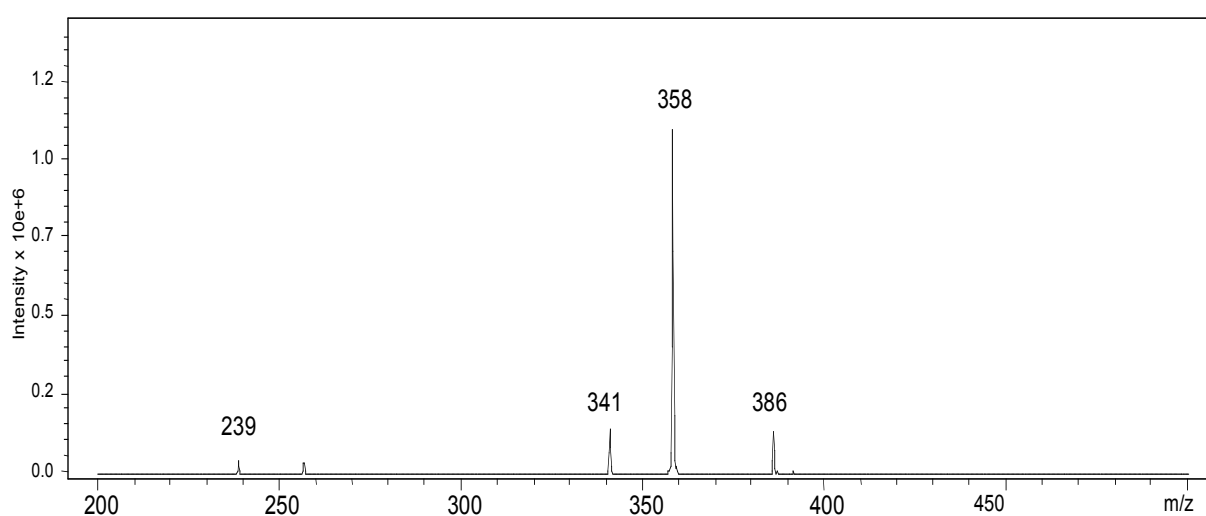


Abbildung 4.4: Fragmente von m/z 404 ($[M+H]^+$)

Um über die gesamte Peakbreite des OTA-Signals (ca. 60 sec) genügend Datenpunkte aufzunehmen, wurde der Ultra Scan-Modus, welcher durch eine hohe Scangeschwindigkeit gekennzeichnet (engl. scan rate) ist, gewählt. Die Anzahl der Datenpunkte wird auch durch die Dauer einer Scan-Sequenz beeinflusst. Diese setzt sich aus dem Füllen der Falle, einer festgelegten Anreicherungszeit sowie der Massenanalyse zusammen und dauert einige Millisekunden. Durch Verkleinern des Parameters „automatische Mittelwertbildung“ (engl. averages) kann die Dauer einer Scan Sequenz reduziert und die Anzahl der Datenpunkte erhöht werden. Die Anzahl an Datenpunkten ist für das optimierte Verfahren größer als 15. Je nach Bedarf wurde nachträglich eine Glättung durchgeführt (Gaussian). Ein weiterer wichtiger Parameter bei der Detektion mit einer Ionenfalle ist die Ionen-Ladungs-Kontrolle (engl. Ion Charge Control; ICC). Durch Aktivieren der ICC kann eine Überladung der

Ionenfalle verhindert und daraus resultierende Signalverbreiterung vermieden werden. Bei Arbeiten im Spurenbereich ist es unter Umständen notwendig, das Füllen der Falle durch Variation der Akkumulierungszeit (engl. maximum accumulation time) manuell zu steuern. Auf diese Art können Empfindlichkeitssteigerungen erzielt werden.

Weitere Parameter, wie z.B. die Trockengastemperatur und der Zerstäubergasdruck wurden ebenfalls optimiert. Hier muß vor allem die Zusammensetzung der mobilen Phase berücksichtigt werden. Die optimierten MS-Parameter sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Tabelle 4.5: Optimierte massenspektrometrische Parameter

Scan Modus	Ultra Scan (27000 m/z/sec)
Polarität	Positiv (negativ auch möglich)
Ionenquelle	Electrospray
Trockengastemperatur	350° C
Zerstäuber	30 psi
Trockengasfluss	10 L/min
Spannung	3500 V
Zielmasse	404
Scanbereich	350-420 m/z
Akkumulierungszeit	200 ms
Ionen-Ladungs-Kontrolle (Target)	50000
Ladungskontrolle (automatisch)	Aus
Durchschnitt der Spektren	2
MRM	+M ³ : 404→358

4.3 Bestimmung von OTA in Rot- und Glühwein

4.3.1 Probenvorbereitung

Die im Rahmen der Methodenentwicklung verwendeten Glüh- und Rotweine wurden in lokalen Supermärkten bezogen. Zunächst wurden die Blindwerte für zwölf Glühweine sowie einen Rotwein bestimmt. Anhand dieser Ergebnisse wurden Proben für die Methodenentwicklung und den Methodenvergleich ausgesucht. Die Proben für Standardadditionen und Wiederfindungen wurden am Tag der Aufarbeitung mit methanolischer OTA-Standardlösung dotiert und am Horizontalschüttler homogenisiert. Sämtliche Proben wurden während der Methodenentwicklung und –validierung im Kühlschrank bei 4° C gelagert. Parallel dazu wurde die Stabilität von OTA in Rotwein geprüft (vgl. 5.1). Diese muß innerhalb der Methodenentwicklung für den Analyten gewährleistet sein, um die Messunsicherheit eines Verfahrens einschätzen zu können.

4.3.2 Methodenentwicklung

Zur Extraktion und Anreicherung von OTA aus Rot- und Glühwein sollte ein neues Verfahren mit kombinierten Anionentauscher/RP-Phasen entwickelt werden. Das Prinzip dieses Verfahrens ist im Kapitel 3.3.5 dargestellt. Analog zu Verfahren mit RP-Säulen werden die kombinierten Phasen durch Übergabe von Methanol aktiviert und mit Wasser konditioniert. Anschließend wird die Probe aufgetragen und das OTA gebunden. Um neben den RP-Eigenschaften der Festphase auch die Anionenaustausch-Wechselwirkungen zu nutzen, muß das OTA durch Erhöhung des pH-Wertes in die dissoziierte Form überführt werden (vgl. 3.2.5). Das kann zum einen durch Zugabe einer Base zur Probelösung oder durch die Verwendung einer basischen Waschlösung erreicht werden. Weiterhin müssen die Auswirkungen der Probeneinwaage auf die Wiederfindung ermittelt werden. Daraus läßt sich die Kapazität der verwendeten Säulen ableiten. Die genannten Aspekte werden neben weiteren ausführlich in Kapitel 4.3.3.5 dargestellt und diskutiert. Nach der Probenaufgabe folgen drei Waschschritte zur Entfernung von Matrixinterferenzen: zunächst wird Ammoniaklösung über die Säule gegeben, um OTA an den quartenären Stickstoffatomen zu binden und ionische Komponenten zu entfernen. Als nächstes wird Methanol aufgetragen, um

neutrale und basische Interferenzen zu entfernen. Da OTA über Anionentauscher-Wechselwirkungen auf der Festphase gebunden ist, wird es an dieser Stelle nicht eluiert. Bei Verwendung von reinen C18-Phasen das OTA eluiert werden, so dass ein Waschschriff mit reinem Methanol nicht möglich ist. Um das gebundene OTA von der kombinierten Phase zu eluieren, muss es zunächst protoniert werden. Dies geschieht durch Übergabe einer sauren Lösung, die gleichzeitig zur Entfernung weiterer Interferenzen genutzt werden kann. Durch Variation der Zusammensetzung dieser dritten Waschlösung kann die Elutionskraft erhöht werden. Die Optimierung wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

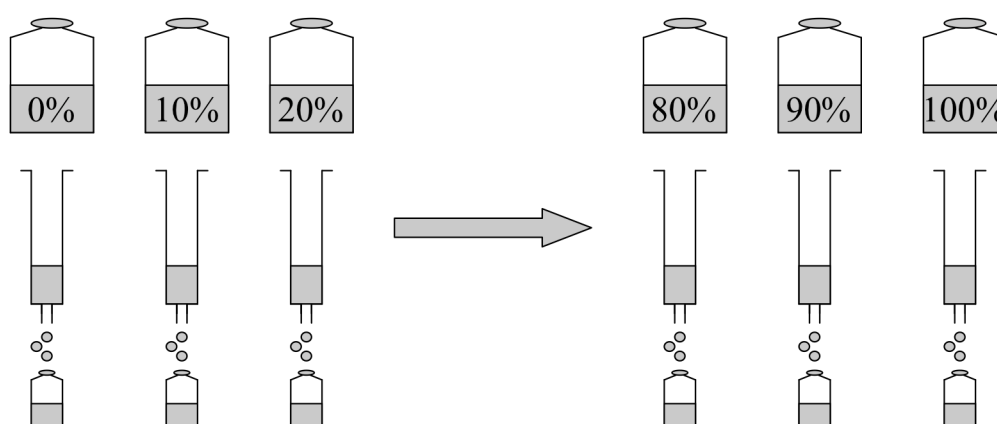


Abbildung 4.5: Optimierung des clean-ups durch Erhöhung des Methanolanteils

Der Methanolanteil in der Waschlösung wurde sukzessiv von 0% bis 100% erhöht und der Durchlauf aufgefangen. Das darin enthaltene OTA wurde mittels LC-MS/MS (Parameter s. 4.2) bestimmt. Anschließend wurden die Peakflächen gegen den Methanolanteil der Waschlösung aufgetragen. Abbildung 4.6 zeigt die Intensität des OTA-Signals als Funktion des Methanolanteils.

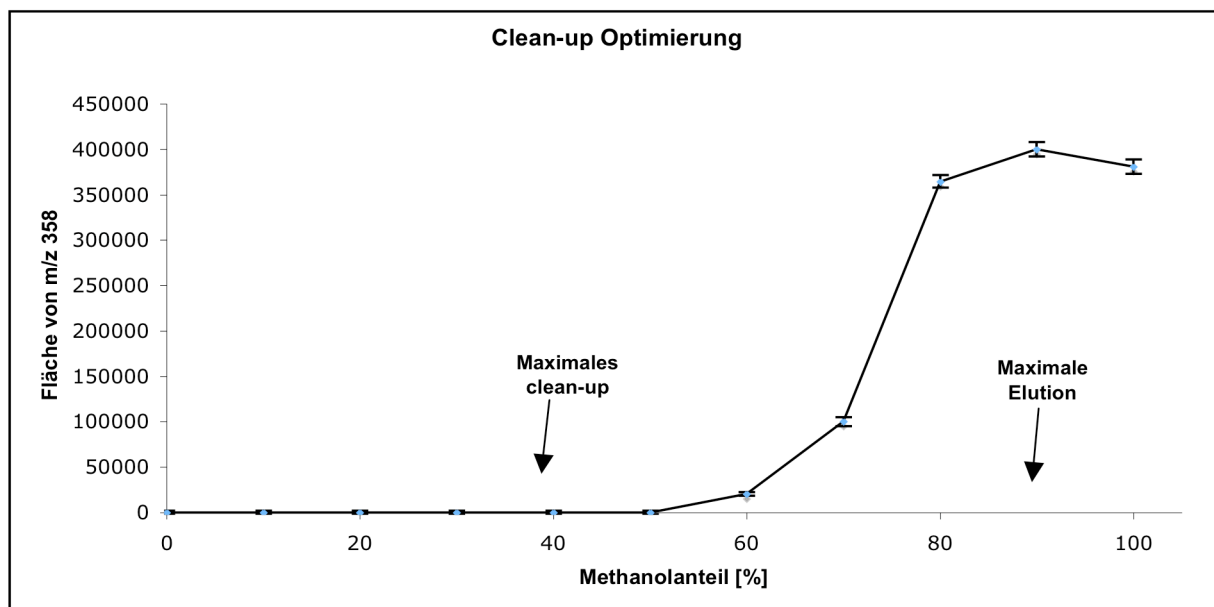


Abbildung 4.6: Optimierung des dritten Waschschrittes

Abbildung 4.6 zeigt, dass der Gehalt an Methanol in der Waschlösung idealerweise 40%, beziehungsweise mindestens 90% im Eluenten beträgt. Durch das Methanol wird die Elutionskraft der Waschlösung erhöht, was zu saubereren Extrakten, geringerer Kontamination der Ionenquelle und -optik sowie Basislinientrennung von Analyt und Störsubstanzen führt.

Als nächstes wurde das entwickelte Verfahren mit einem modifizierten Standardverfahren [55] sowie einem clean-up an RP-Phasen (vgl. 3.3.3) verglichen. Die Modifizierung des Standardverfahrens wurde auf die gravimetrische Herstellung der OTA-Standards (vgl. 4.1.1) sowie den Einsatz der LC-MS/MS (vgl. 4.2) zur Bestimmung des OTA beschränkt. Alle weiteren Schritte, wie das clean-up an Immunaффinitätssäulen, wurde in Anlehnung an die Norm durchgeführt. Das entwickelte Verfahren wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt und bereits vor Fertigstellung dieser Arbeit publiziert [101]:

Vorbereitung der Festphase:

Die Säule wird mit jeweils 1 mL MeOH und H₂O konditioniert und equilibriert. Im Gegensatz zu C18 und Immunaффinitätssäulen können die Säulen trocken laufen.

Extraktion von OTA:

Es werden etwa 10 g Wein direkt auf die Säule gegeben. Das Probengefäß wird dann mit 2 mL Wasser gespült und dieses ebenfalls auf die Säule gegeben. Letztendlich wird die Probe

durch Anlegen eines Vakuums oder auch durch Schwerkraft durch die Säule gesogen. Die Fließgeschwindigkeit sollte etwa 1 mL/min betragen.

Waschen der Säule:

Die Säule wird mit 1 mL 1% Ammoniaklösung, 1 mL MeOH und 1 mL 1% methanolischer HCl-Lösung (40% MeOH) gewaschen. Die verbliebenen Wasserrückstände werden mittels Durchsaugen von Luft entfernt.

Elution des Analyten:

Die Analyten werden mit 2 x 0,5 mL eines Gemisches aus MeOH/Eisessig (98+2; v/v) von der Säule in ein geeignetes Auffanggefäß eluiert. Zur Angleichung an die mobile Phase werden 0,25 mL H₂O auf die Säule gegeben und ins Auffanggefäß eluiert. Diese Lösung wird mittels LC-MS/MS analysiert.

Einengen des Eluates:

Sofern es die Bestimmungsgrenze erfordert, kann das Eluat im Stickstoffstrom eingengt und mit einem geringeren Volumen Fließmittel aufgenommen werden. In diesem Fall sollte zuvor nur mit Methanol eluiert werden, da sich dieses leichter einengen läßt. Ein derartiger Schritt ist unter Umständen erforderlich, wenn Säulen mit größerer Packung und dementsprechend auch ein größeres Elutionsvolumen verwendet werden.

Abbildung 4.7 zeigt ein Chromatogramm des vorgestellten clean-ups und im Vergleich dazu Chromatogramme nach Aufarbeitung gemäß [55] und einem clean-up an RP-Phasen:

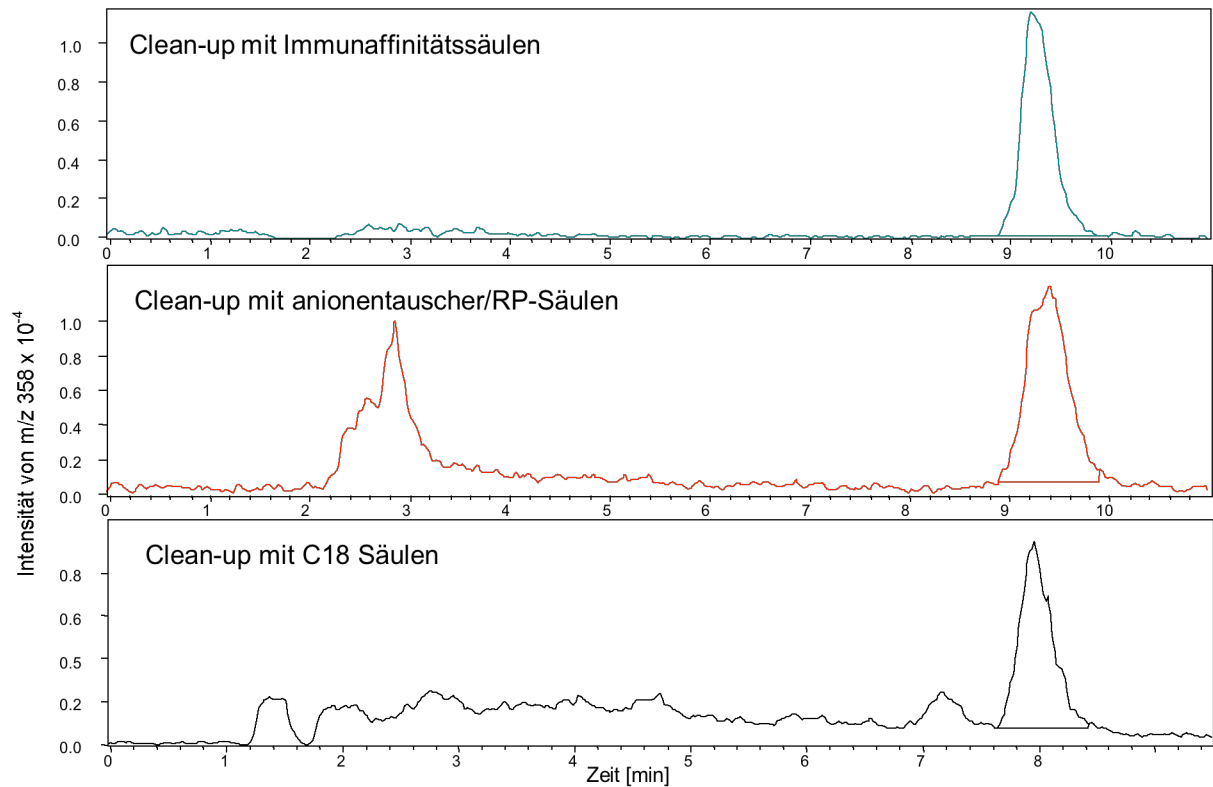


Abbildung 4.7: Chromatogramme von Glühweinextrakten nach unterschiedlicher Aufarbeitung

Während im vorgestellten clean-up eine Basislinientrennung von OTA und Störsubstanzen erreicht wird, treten im Chromatogramm nach C18 clean-up signifikante Störpeaks um das OTA-Signal auf. Des weiteren verdeutlicht die erhöhte Basislinie während der gesamten Analyse das Vorhandensein nicht abgetrennter Interferenzen. Die Kombination von clean-up mit Immunaффinitätssäulen und LC-MS/MS zeigt die beste Leistung im Vergleich zur vorgestellten Methode sowie zum C18 clean-up. Die kombinierten Anionentauscher/RP-Phasen sind jedoch erheblich günstiger in der Anschaffung, einfacher in ihrer Handhabung und wesentlich robuster. Vor allem die Robustheit ist im Laboralltag von immenser Bedeutung, wenn bereits kleinste Unaufmerksamkeiten während der Extraktion zu schlechten Wiederfindungen führen. Im Gegensatz zu Immunaффinitätssäulen sind die kombinierten Phasen weniger spezifisch und können für verschiedene Analyten parallel genutzt werden. Des weiteren können die Säulen wiederverwendet werden, was mit Immunaффinitätssäulen nicht möglich ist.

4.3.3 Validierung des Verfahrens

Um die Qualität eines neuen Verfahrens überprüfen zu können, muß dieses validiert werden. Darunter versteht man die systematische Überprüfung der wesentlichen Arbeitsschritte mit der Absicht, die Eignung des Verfahrens für einen bestimmten Zweck zu zeigen. Dazu müssen zunächst alle relevanten Verfahrensmerkmale ermittelt werden. In diesem Zusammenhang sind die Bestimmungs- und Nachweisgrenze zu nennen, da diese im Rahmen von Methodenvergleichen innerhalb der Spurenanalytik als wichtige Leistungsmerkmale herangezogen werden [95, 96, 97, 98, 99].

Die Validierung des vorgestellten Verfahrens wurde auf der Grundlage der bereits vorgestellten Vorschrift durchgeführt, welche lediglich bei der Ermittlung der Robustheit entsprechend abgewandelt wurde. Die Abweichung wurde bei der Auswertung berücksichtigt. Es wurden sowohl natürlich kontaminierte als auch dotierte Proben eingesetzt.

4.3.3.1 Linearität

Zur Bestimmung der Linearität des LC-MS/MS-Systems wurden sechs OTA-Standards im Konzentrationsbereich von 3,0 µg/kg bis 50,0 µg/kg sechs mal vermessen. Bei der Berechnung wurden die Mittelwerte der Peakflächen gegen die Konzentrationen aufgetragen. Die Kalibrierkurven wurden als Trendlinien (Typ: linear) berechnet. Es wurde das Bestimmtheitsmaß ermittelt, um die Güte der Anpassung der Kalibrierfunktion an die Kalibrierwerte zu erfassen.

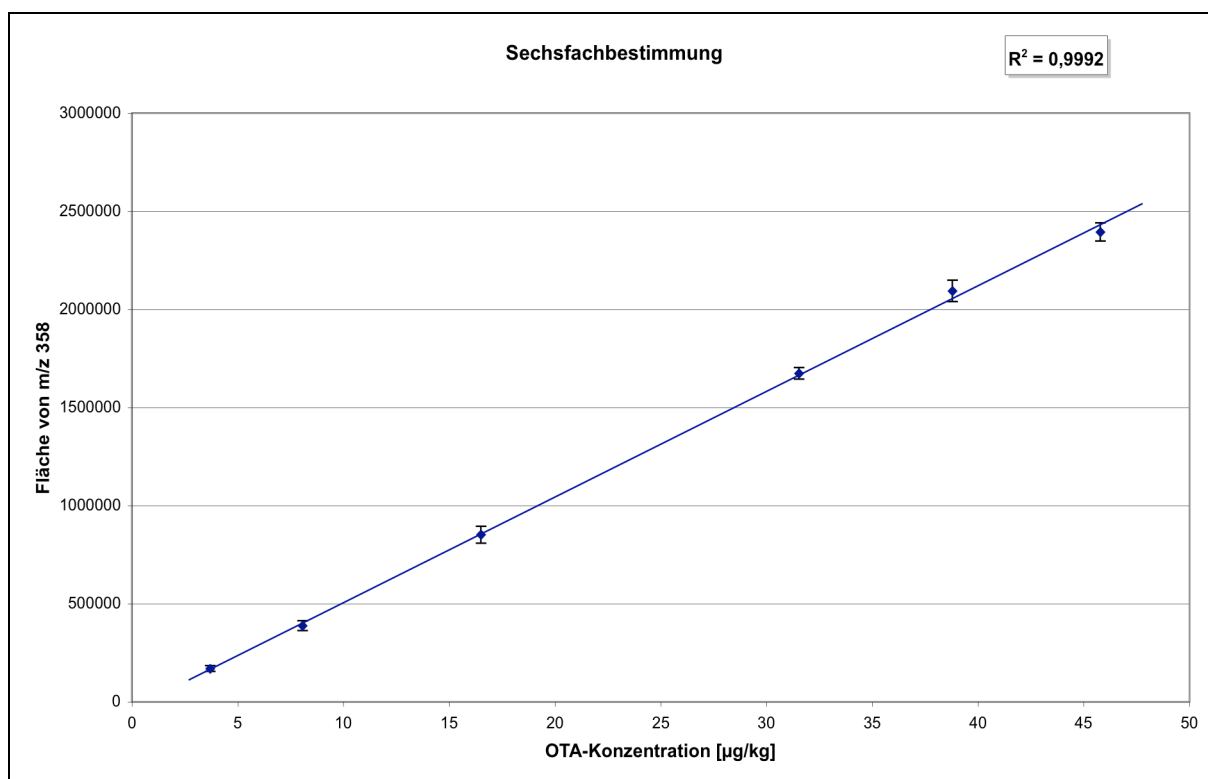


Abbildung 4.8: Linearität von OTA Standardlösungen

Abbildung 4.8 zeigt, dass die Linearität zwischen 3,0 µg/kg und 50,0 µg/kg gegeben ist. Der Korrelationskoeffizient liegt bei $R^2 = 0,9992$ und war innerhalb der gesamten Validierung nicht schlechter als $R^2 = 0,993$. Aus weiteren Versuchen läßt sich ableiten, dass die Linearität des Gerätes wesentlich größer ist. Der Anpassungstest nach Mandel [76] ergab, dass die lineare Kalibrierfunktion signifikant besser ist als die quadratische. Auf Grund dieser Tatsache sind Probleme, wie z.B. die Überfüllung der Ionenfalle, nicht mehr von Bedeutung. Die OTA-Standardlösungen wurden zur externen Kalibrierung erfolgreich eingesetzt.

4.3.3.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die kleinste nachweisbare (LOD) sowie die kleinste quantifizierbare Menge (LOQ) wurde jeweils mit der Kalibriermethode ermittelt. Da dieses Verfahren lediglich die Nachweis- und Bestimmungsgrenze des Systems darstellt, muß die Anreicherung während der Probenvorbereitung berücksichtigt werden. Der Anreicherungsfaktor ergibt sich aus dem Verhältnis der Masse der eingewogenen Probe (m_{Probe}) zu der Masse des Eluates (m_{Eluat}). Die

Nachweisgrenze ($NG_{absolut}$) des gesamten Verfahrens wird nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$NG_{absolut} = NG_{Kalibriermethode} \times \frac{m_{Probe}}{m_{Eluat}}$$

Gleichung 4.2: Berechnung der Nachweisgrenze in Rot- und Glühwein

Durch Einsetzen der Bestimmungsgrenze aus der Kalibriergeradenmethode in Gleichung 4.2 kann die Bestimmungsgrenze für das gesamte Verfahren berechnet werden.

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze von OTA in Rot- und Glühwein beträgt 0,2 µg/kg und 0,7 µg/kg.

Tabelle 4.6: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Kalibrierpunkte/Messungen	Nachweisgrenze	Bestimmungsgrenze
6/6	0,2 µg/kg	0,7 µg/kg

Die Ergebnisse liegen damit in einem sehr guten Bereich und sind mit Werten, ermittelt mit standardisierten LC-FLD-Verfahren, vergleichbar [55]. Darüber hinaus ist die vorgestellte Methode leistungsstark genug, um momentan geltende Höchstmengen mühelos bestimmen zu können (vgl. 3.2.6). Aus der Bestimmungsgrenze läßt sich ein unterer Arbeitsbereich von > 0,7 µg/kg ableiten.

4.3.3.3 Präzision

Im Rahmen der Methodvalidierung wurde die konzentrationsabhängige Messpräzision durch Wiederholmessungen von OTA-Standards, die Methodenpräzision durch Mehrfachbestimmung einer Probe mit unabhängigen Einwaagen und eine laborinterne Vergleichspräzision, an der sich drei Personen beteiligt haben, ermittelt.

Tabelle 4.7: Messpräzision

Niveaus/Messwerte	Konzentrationsbereich	RSD
7/6	3 – 46 µg/kg	2 – 9 %

Die Messpräzision ist konzentrationsabhängig und liegt für kleinere Niveaus bei 9%. Mit steigender Konzentration nimmt die Präzision zu und erreicht ein Minimum bei ca. 2% (vgl. Abbildung 4.9). Dieser Wert ist für die quantitative Bestimmung mit einer Ionenfalle bei Konzentrationen im Bereich der Bestimmungsgrenze als sehr gut einzuschätzen.

Im Rahmen der Methodenvalidierung wurden Extrakte von Proben vermessen, deren Konzentration aufgrund der Anreicherung innerhalb der Festphasenextraktion über 10 µg/kg lagen. Der Beitrag der Messpräzision zur Gesamtunsicherheit des Verfahrens liegt somit bei höchstens 6%.

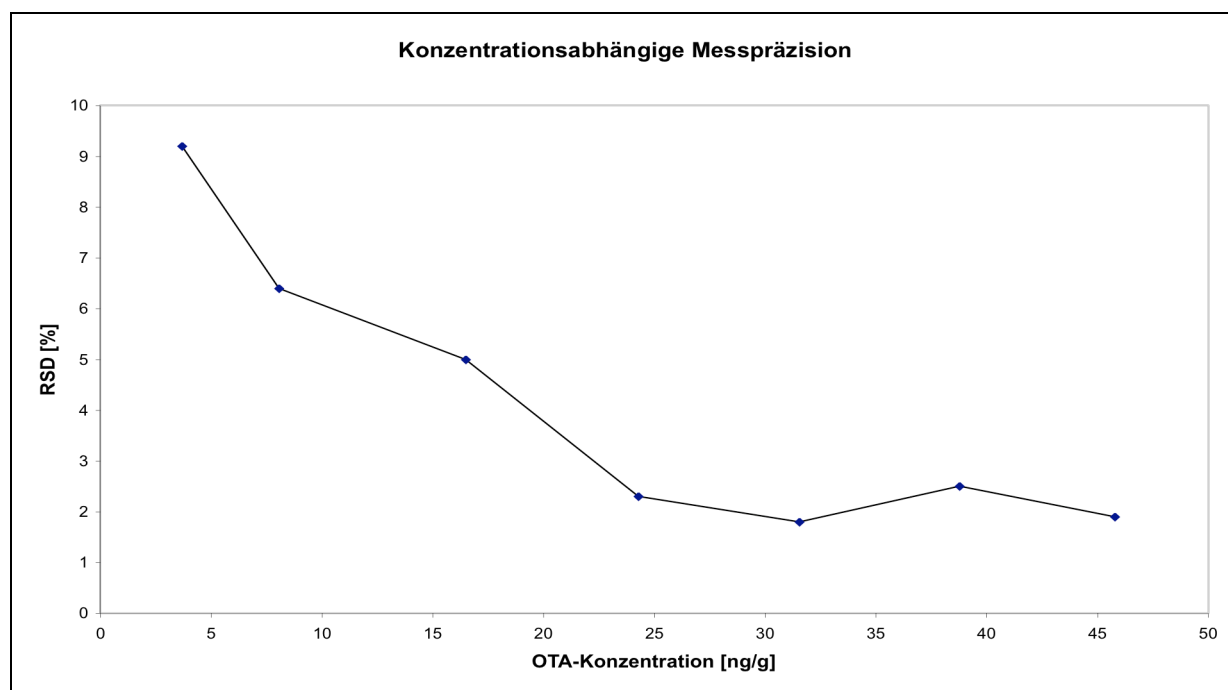
**Abbildung 4.9: Zusammenhang zwischen Messpräzision und Konzentration an einer Ionenfalle**

Tabelle 4.8 zeigt, dass die Methodenpräzision bei 6% liegt und mit den standardisierten LC-FLD-Verfahren vergleichbar ist. Berücksichtigt man die Konzentrationen der Extrakte (hier: 10-14 µg/kg), so kann man sagen, dass die Messpräzision den kompletten Beitrag zur

Methodenpräzision liefert.

Tabelle 4.8: Methodenpräzision

Messwerte	Mittelwert	RSD
6	1,40 µg/kg	6 %

Innerhalb einer in-Haus Validierung wurde die Vergleichspräzision mit 10% ermittelt und ist ebenfalls mit standardisierten LC-FLD-Verfahren vergleichbar. Die mittlere Methodenpräzision lag bei 8%. Unter Berücksichtigung einer wesentlich besseren Messpräzision eines Fluoreszenzdetektors ($RSD < 2\%$) liefert das entwickelte clean-up einen geringeren Beitrag zur Methodenunsicherheit als das Standardverfahrens [55].

Tabelle 4.9: Vergleichspräzision; n=3

Teilnehmer	Mittelwert	Methodenpräzision	Vergleichspräzision
1	1,36 µg/kg	8%	10%
2	1,40 µg/kg		
3	1,59 µg/kg		

4.3.3.4 Richtigkeit

Im Rahmen der Methodvalidierung wurde die Richtigkeit des Verfahrens durch Methodenvergleich mit einem modifizierten Standardverfahren, durch Bestimmung der Wiederfindung auf unterschiedlichen Konzentrationsniveaus sowie durch ein Standardadditionsverfahren bestimmt. Die Modifizierung des Standardverfahrens war auf die Bestimmung des OTA (hier: LC-MS/MS) sowie die Herstellung des Standards (hier: gravimetrisch, vgl. 4.1) limitiert, um die Probenvorbereitung besser vergleichen zu können. Auf eine Validierung des modifizierten Verfahrens wurde verzichtet, da die Unsicherheitsbeiträge der Modifikationen aus den hier ermittelten Daten abgeleitet werden können.

Tabelle 4.10: Soll/Ist-Vergleich mit modifiziertem Standardverfahren (n = 6)

Verfahren	Mittelwert	RSD
LC-MS/MS	1,40 µg/kg	6 %
mod. Normverfahren	1,34 µg/kg	16 %

Die Ergebnisse wurden unter Berücksichtigung der Anzahl an Wiederholmessungen (n), der Standardabweichung und der Mittelwerte verglichen (t-Test). Damit konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse der neuen Methode mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit ($P = 95\%$; Freiheitsgrad = $n-1$) innerhalb des Vertrauensbereiches des zuvor ermittelten Referenzwertes liegen.

Ein weiteres Merkmal zur Bestimmung der Richtigkeit eines Verfahrens ist die Ermittlung der Wiederfindung. Dazu wurden natürlich kontaminierte Glühweinproben sowie Rotweine mit OTA versetzt und die Wiederfindung, bezogen auf den gesamt OTA-Gehalt, ermittelt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 4.11: Wiederfindungen von OTA in Rot- und Glühweinproben (n = 3; u, v, w, x, y, z = zugesetzte OTA Mengen)

Probe	Mittelwert	Theoretischer Gehalt	WF	RSD
Glühwein _{1+u}	1,40 µg/kg	1,34 µg/kg	104%	6%
Glühwein _{1+v}	2,36 µg/kg	2,25 µg/kg	105%	4%
Glühwein _{1+w}	2,43 µg/kg	2,50 µg/kg	103%	6%
Glühwein _{1+x}	3,10 µg/kg	3,48 µg/kg	89%	12%
Glühwein _{1+y}	3,46 µg/kg	3,82 µg/kg	91%	6%
Glühwein _{1+z}	5,20 µg/kg	5,53 µg/kg	94%	1%
Rotwein _{1+w}	1,65 µg/kg	1,65 µg/kg	100%	9%

Die Wiederfindungen liegen zwischen 89% und 105%. Die Variationskoeffizienten wurden durchschnittlich mit 6% ermittelt. Diese sind damit identisch mit der zuvor gezeigten Vergleichspräzision (vgl. 4.3.3.3). Außerdem wird durch die Bestimmung der Wiederfindung und dem Methodenvergleich (s. Tabelle 4.10) verdeutlicht, dass sich natürlich kontaminierte

und dotierte Proben bei der Extraktion des OTA identisch verhalten.

Die Richtigkeit des vorgestellten Analyseverfahrens wurde mit dem Standardadditionsverfahren bestätigt. Bei diesem Verfahren können Matrixeffekte, welche das Ergebnis beeinflussen, eliminiert werden. Gerade bei schwierigen Matrices sollte dieses Verfahren ergänzend angewandt werden. In diesem Fall wurde ein natürlich kontaminierter Glühwein dotiert und jedes Konzentrationsniveau dreimal aufgearbeitet. Die erhaltenen Signalintensitäten wurden gegen die zugesetzten OTA-Gehalte aufgetragen. Abbildung 4.10 zeigt, dass die Korrelation zwischen den Konzentrationsniveaus 0,9931 beträgt. Der OTA-Gehalt im natürlich kontaminierten Glühwein beträgt 1,58 µg/kg. Dies entspricht einer Abweichung von 18% bezogen auf das Ergebnis des Standardverfahrens. Unter Berücksichtigung der Variationskoeffizienten, liefern beide Verfahren gleiche Ergebnisse.

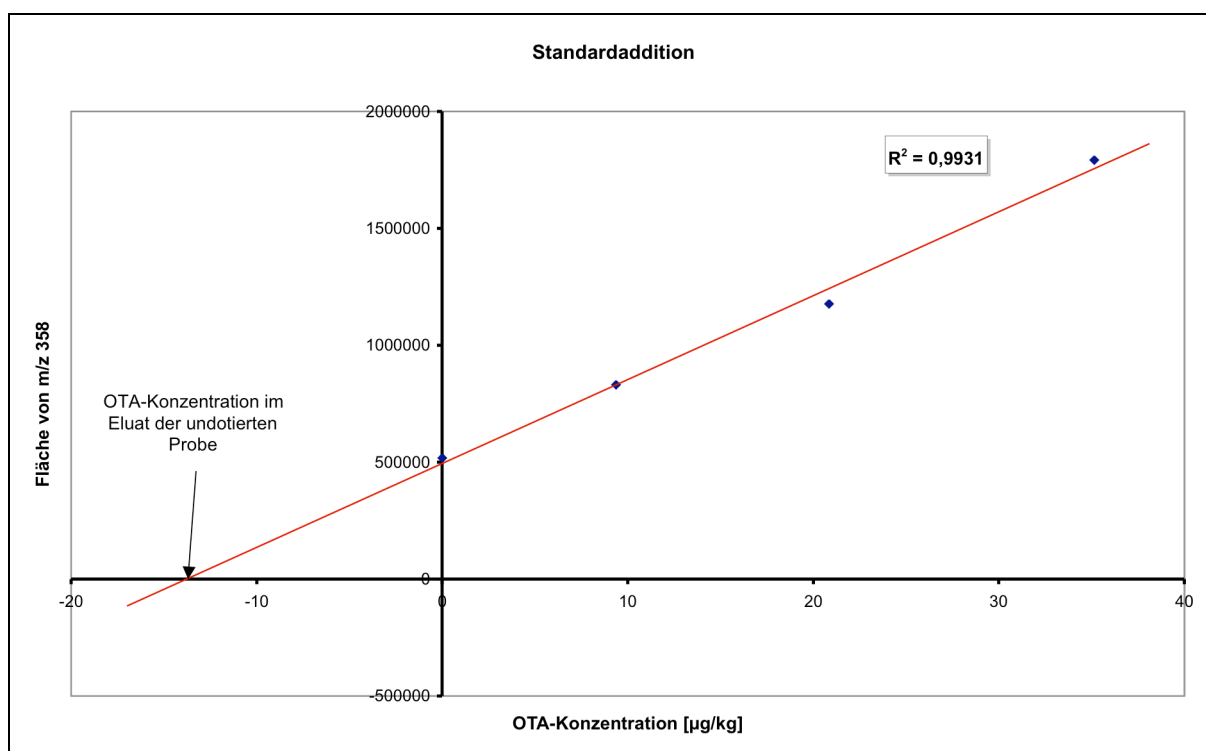


Abbildung 4.10: Bestimmung von OTA in Glühwein mittels Standardadditionsverfahren

4.3.3.5 Robustheit

Zur Ermittlung der Robustheit eines Verfahrens müssen zunächst alle kritischen Einflussfaktoren identifiziert werden. Diese werden systematisch variiert und ihre Auswirkungen auf die Messgröße ermittelt. Im Rahmen der Bestimmung von OTA in Rot- und Glühwein wurden die folgenden Einflussfaktoren ermittelt und systematisch variiert:

- Einwaage
- pH-Wert der Probe
- Verdünnung der Probe
- Matrix
- Bearbeiter

Zunächst wurde die Einwaage systematisch erhöht und die Wiederfindung ermittelt. In Tabelle 4.12 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 4.12: Variation der Einwaage (n=3)

Einwaage	Mittelwert	Theoretischer Gehalt	WF	RSD
8 g	1,40 µg/kg	1,34 µg/kg	104%	6%
14 g	1,48 µg/kg	1,34 µg/kg	106%	4%
18 g	1,86 µg/kg	1,34 µg/kg	139%	8%

Die Erhöhung der Probeneinwaage von 8 g auf 14 g hatte keine Auswirkung auf die Wiederfindung. Die Erhöhung auf 18 g liefert jedoch schlechte Ergebnisse. Da man bei einer zu hohen Einwaage eine Überladung der Säule und Minderbefunde erwartet, handelt es sich hier um einen Ausreißer, welcher auf Geräte- und chemisches Rauschen zurückzuführen ist. Gerade in der Spurenanalytik können kurzzeitige Schwankungen im Messsystem zu falschen Ergebnissen führen. Genauere Aussagen diesbezüglich müssten durch weitere Wiederholmessungen verifiziert werden.

Als nächstes wurde die Auswirkung des pH-Wertes der Probe ermittelt. Dazu wurde der Probe Ammoniaklösung zugesetzt und der pH-Wert erhöht. Die Auswirkungen auf die Wiederfindung sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

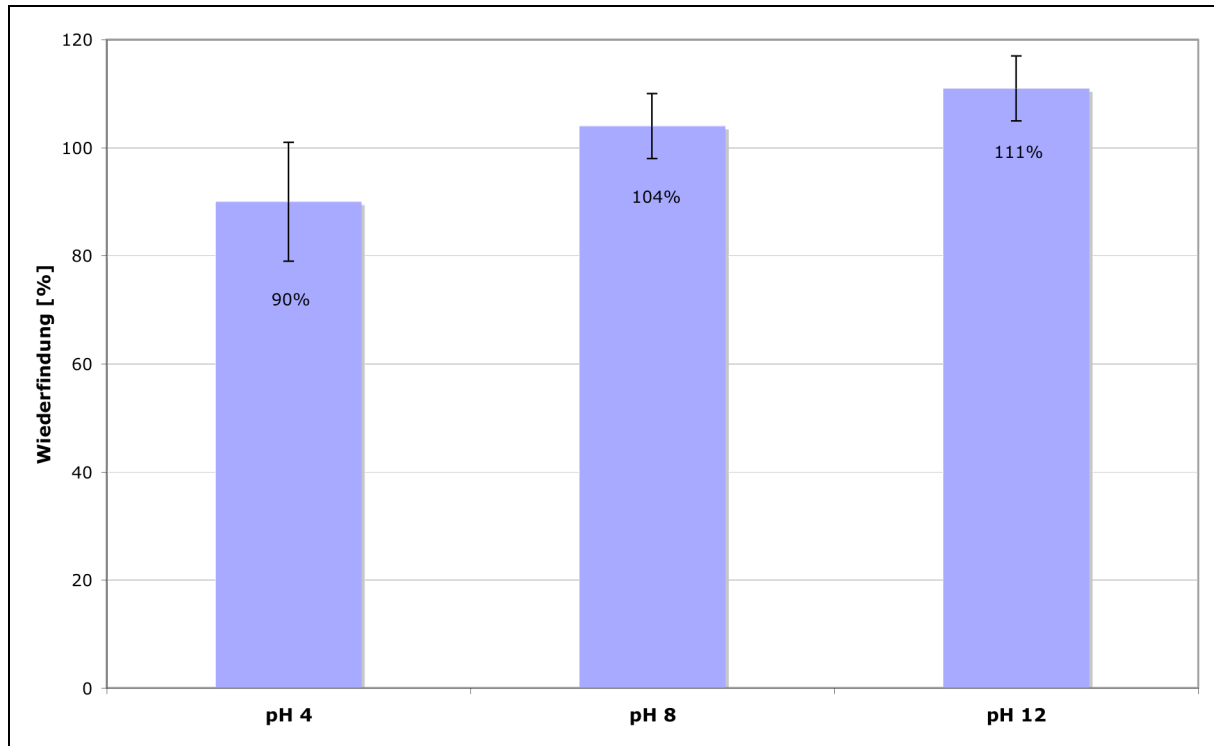


Abbildung 4.11: Zusammenhang zwischen pH-Wert und Wiederfindung

Wie aus Abbildung 4.11 ersichtlich, hat der pH-Wert der Probe nur einen geringen Einfluss auf die Wiederfindung. Zur Induzierung des Anionentauschermechanismus reicht die Übergabe einer 1% Ammoniaklösung innerhalb des ersten Waschschriffs aus. Damit kann auf die Erhöhung des pH-Wertes der Probe verzichtet werden (vgl. 3.2.5).

Die Verdünnung der Probe mit Wasser zur Reduzierung des Alkoholanteils ist ebenfalls nicht notwendig. Die im Rot- oder auch Glühwein enthaltene Menge an Alkohol reicht nicht aus, um die Bindung des OTA an die Festphase zu beeinflussen. Der Vergleich zwischen verdünnter und unverdünnter Probe ist in der folgenden Tabelle veranschaulicht.

Tabelle 4.13: Verdünnung der Weinprobe mit Wasser (n=3)

Probe	Mittelwert	Theoretischer Gehalt	WF	RSD
verdünnt	1,40 µg/kg	1,34 µg/kg	104%	6%
unverdünnt	1,20 µg/kg	1,34 µg/kg	90%	12%

Die Wiederfindungen liegen mit jeweils 90% und 104% im geforderten Bereich [100]. Für die verdünnte Probe wurde jedoch eine bessere Wiederfindung als auch Standardabweichung erzielt. Die Unterschiede sind vermutlich nicht auf die Verdünnung der Probe, sondern auf endogene Effekte zurückzuführen. Dies wird durch die in Kapitel 4.4.3.4 aufgeführten Wiederfindungen (89% - 105%) und Standardabweichungen (4% - 12%), welche mit unverdünnten Proben erzielt wurden, bestätigt. Weiterhin ist die Methode sowohl auf Rot- als auch auf Glühwein anwendbar und unabhängig vom Bearbeiter (vgl. Kapitel 4.3.3.3).

4.4 Bestimmung von OTA in Bier

4.4.1 Probenvorbereitung

Die im Rahmen der Methodenentwicklung verwendeten Biere wurden in lokalen Supermärkten bezogen. Zunächst wurden die Proben im Ultraschallbad entgast und anschließend sämtliche Blindwerte bestimmt. Da keine natürlich kontaminierten Proben vorhanden waren, wurde die Methodentwicklung und –validierung ausschließlich an dotierten Bieren durchgeführt. Es wurde angenommen, dass die Extrahierbarkeit des OTA aus dotierten und natürlich kontaminierten Proben identisch ist. Sämtliche Rückstellproben wurden während der Methodenentwicklung im Kühlschrank bei 4° C gelagert.

4.4.2 Methodenentwicklung

Zunächst wurde versucht, dass für Rot- und Glühwein entwickelte Verfahren (vgl. 4.3.2) auf Bier zu übertragen [101]. Abbildung 4.12 zeigt das Chromatogramm eines Bierextraktes nach der Aufarbeitung analog zu Rot- und Glühweinproben.

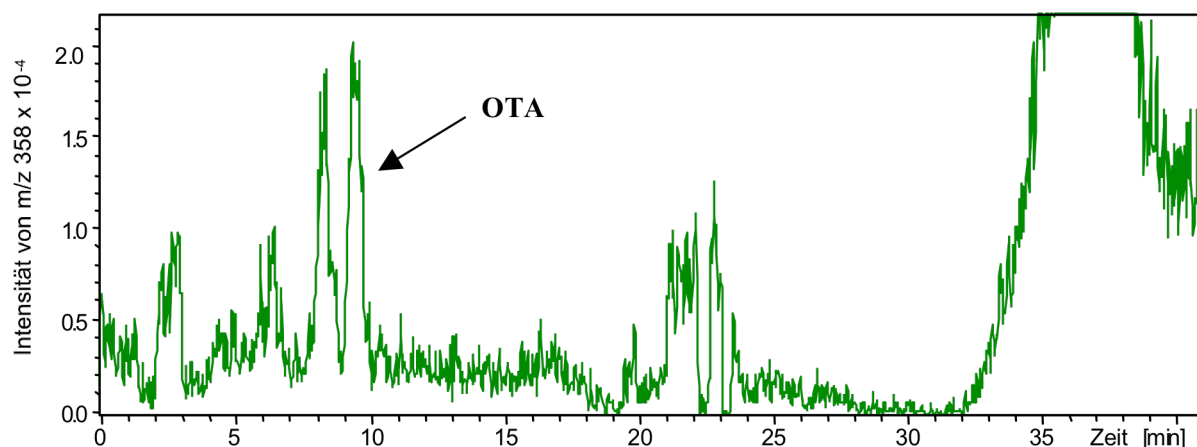


Abbildung 4.12: Chromatogramm eines Bierextraktes nach Anionentauscher/RP clean-up; MRM von m/z 358

Neben dem OTA Signal bei 9,5 min sind noch weitere Signale von Matrixinterferenzen erkennbar. Außerdem ist die Basislinie um das OTA Signal stark erhöht, was auf coeluierende Substanzen hindeutet. Dadurch wird auch die Ionisation zu Ungunsten der Peakform beeinflusst. Weiterhin ist ein großes Signal zwischen 30-40 min sichtbar. Das stört nicht die aktuelle Analyse, muß jedoch bei nachfolgenden Läufen beachtet werden. Das notwendige Spülen der Säule verlängert die Analysenzeiten im Vergleich zur Bestimmung von OTA in Wein. Um das clean-up zu verbessern, wurden folgende Reinigungsschritte in die Probenvorbereitung einbezogen und verglichen:

- Membranfiltration (0,45 µm) der Proben
- Fällung mit Aceton
- Fällung mit Acetonitril
- Fällung mit Carrez-Lösung I+II (vgl. 7.2)

Das Ziel war, vor allem Proteine aus dem Bier zu entfernen. Diese gehören zwar mit 0,5% zu den Nebenkompenten, beeinflussen die LC-MS/MS Analytik jedoch erheblich [102]. Da diese durch das vorgestellte clean-up nicht abgetrennt werden können, wurde bereits gezeigt (vgl. Abbildung 4.12). Auf die Verwendung von weiteren Klärungsmitteln wie Trichloressigsäure oder Bleiessig, welche ebenfalls zur Fällung von Proteinen verwendet werden, wurde aufgrund ihrer toxikologischen Eigenschaften verzichtet [103].

Zur Fällung der Proteine wurden 20 mL Aceton oder Acetonitril sowie 2 mL Carrez-Lösung I+II den verschiedenen Bierproben zugefügt. Die Fällungen wurden für zwei Minuten abgewartet und die Lösungen anschließend zentrifugiert. Die Überstände wurden analog der Weinvorschrift aufgearbeitet und das OTA mittels LC-MS/MS bestimmt (vgl. 4.3.2). Durch dieses Versuchsdesign läßt sich der Einfluss der Fällung auf das clean-up ermitteln. Abbildung 4.13 zeigt die Auswirkungen der verwendeten Fällungsreagenzien auf die Bestimmung von OTA mittels LC-MS/MS.

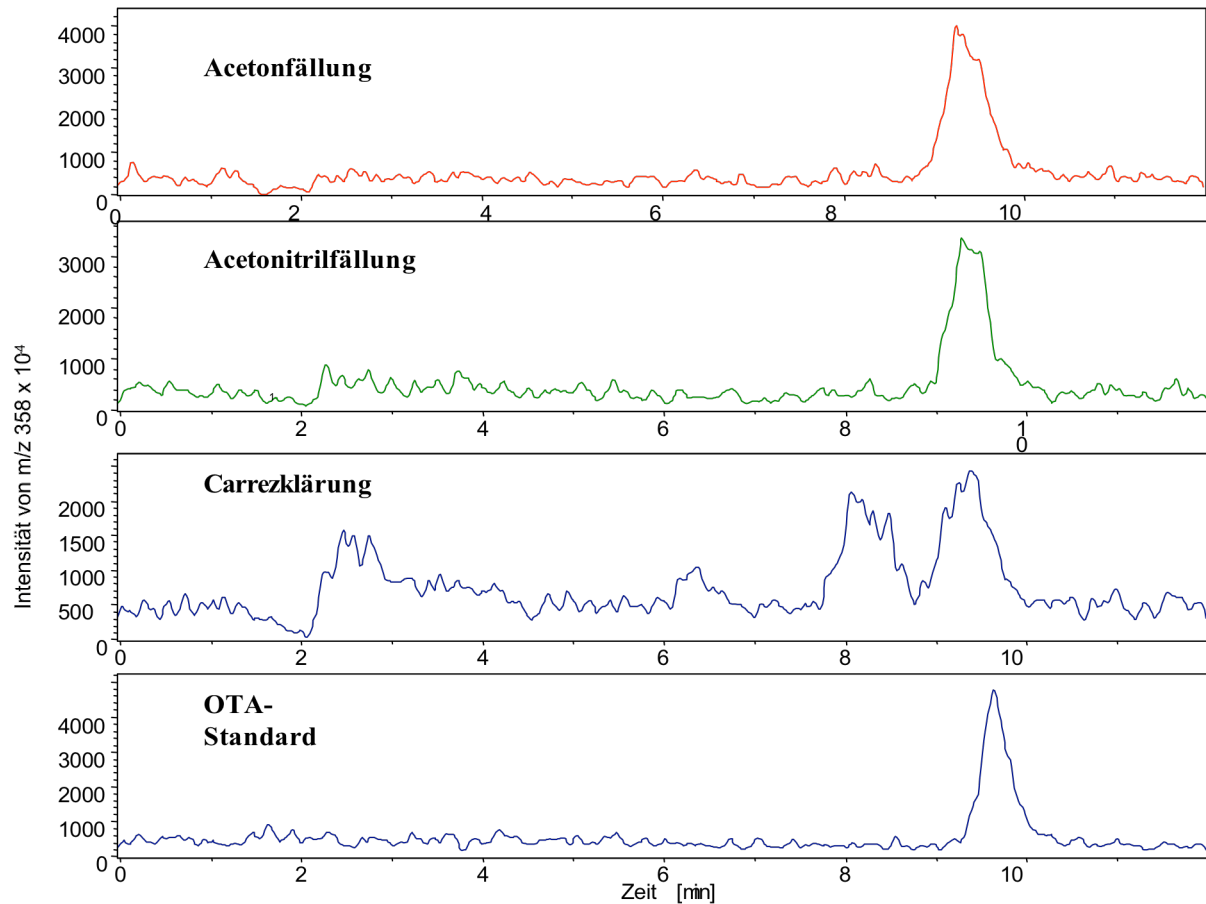


Abbildung 4.13: Vergleich von Fällungsreagenzien

Zum einen wird deutlich, dass die Fällung mit organischen Lösungsmitteln bessere Ergebnisse liefert als die Carrezklärung. Diese ist somit für die Bestimmung von OTA in Bier nicht geeignet. Die Chromatogramme nach Aceton- und Acetonitrilfällung zeigen einen ähnlichen Verlauf wie das eines OTA-Standards. Es sind weder Störungen durch Interferenzen noch ein erhöhtes Grundlinienrauschen zu erkennen. Damit wird deutlich, dass eine Fällung mit Aceton oder Acetonitril in Kombination mit Anionentauscher/RP-Säulen einen wichtigen Beitrag zum gesamten clean-up darstellt. Aufgrund des niedrigen Siedepunktes und der geringeren Toxizität, was die Handhabung im Labor erleichtert, wurde Aceton als Klärungsmittel in die Probenvorbereitung einbezogen.

Als nächstes soll das hier vorgestellte clean-up mit Standardverfahren verglichen werden. Dabei ist von besonderem Interesse, inwieweit sich Unterschiede zum clean-up an Immunaффinitätssäulen oder auch an RP-Phasen ergeben [55]. Dazu wurde eine Probe nach einem modifizierten Standardverfahren für Biere sowie einem clean-up an C18-Material (vgl. 3.3.3) aufgearbeitet. Analog dem Methodenvergleich in Kapitel 4.3.2, war die Modifizierung des Standardverfahrens auf die Herstellung der OTA-Standards (vgl. 4.1.1) sowie die

Bestimmung des OTA mittels LC-MS/MS (vgl. 4.2) beschränkt. Das vorgestellte Verfahren wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt und konnte, ebenso wie das Verfahren zur Bestimmung von OTA in Wein, vor Fertigstellung dieser Arbeit publiziert werden [104]:

Vorbereitung der Probe:

10 g Bier werden mit 20 mL Aceton versetzt, die Proteinfällung abgewartet (ca. 2 min) und die gesamte Lösung zentrifugiert. Der Überstand wird weiterverwendet.

Vorbereitung der Festphase:

Die Säule wird jeweils mit 1 mL MeOH und H₂O konditioniert und equilibriert. Im Gegensatz zu C18 und Immunaффinitätssäulen können die Säulen trocken laufen.

Extraktion von OTA:

Der Überstand der vorbereiteten Probe wird mit 20 mL Wasser versetzt und auf die Säule gegeben. Dabei ist zu beachten, dass der Anteil an organischem Lösungsmittel aus der vorangegangenen Klärung nicht zu groß ist (je nach Elutionskraft 20-40%). Das Probengefäß wird dann mit 2 mL Wasser gespült und dieses ebenfalls auf die Säule gegeben. Letztendlich wird die Probe durch Anlegen eines Vakuums oder auch durch Schwerkraft durch die Säule gesogen. Die Fließgeschwindigkeit sollte etwa 1 ml/min betragen.

Die weitere Aufarbeitung (Waschen, Elution und Einengen des Analyten) erfolgte analog des für Wein entwickelten Verfahrens (vgl. 4.3.2).

Die Chromatogramme des Methodenvergleichs werden in der folgenden Abbildung mit dem hier vorgestellten Verfahren verglichen.

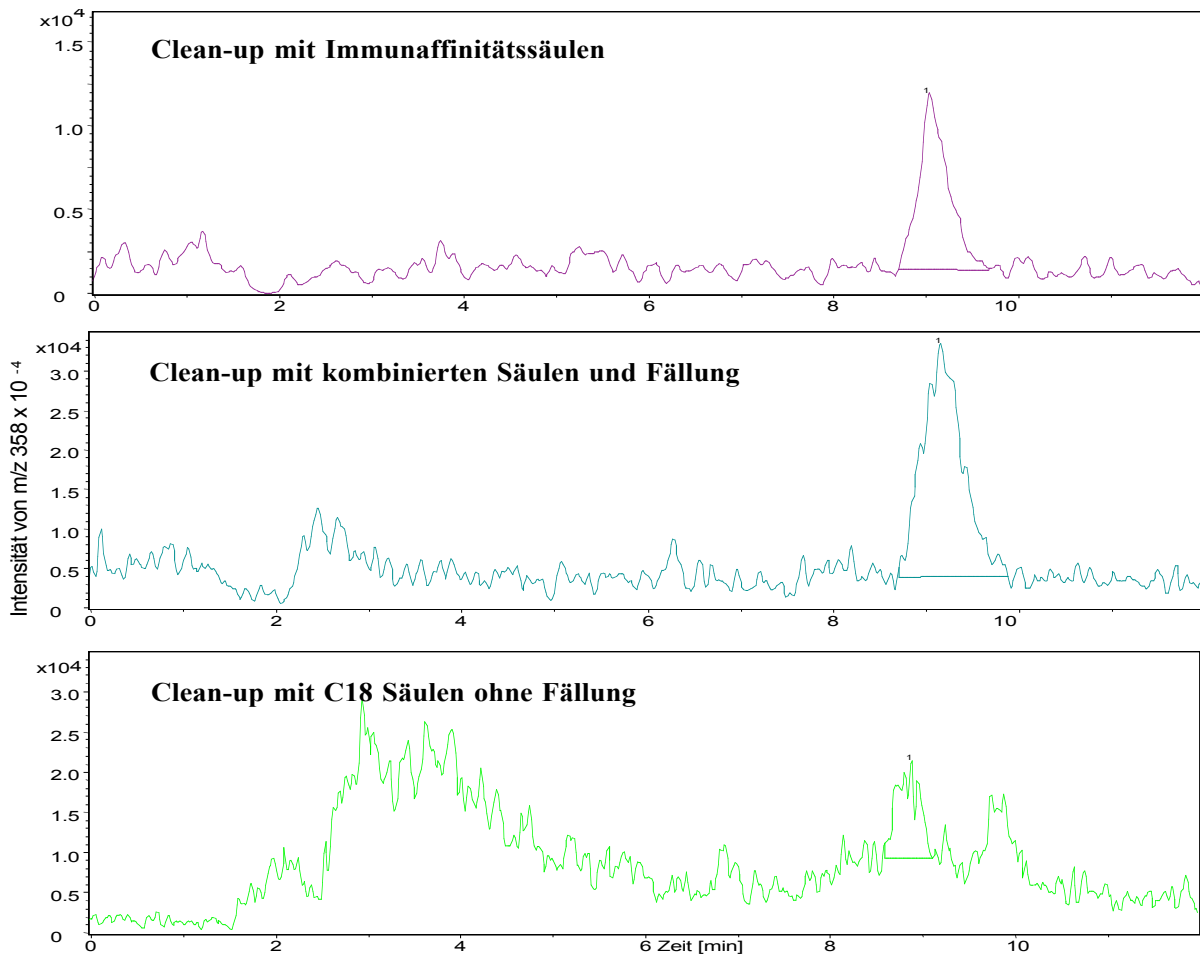


Abbildung 4.14: OTA in Bier nach verschiedenen clean-up Verfahren

Während im vorgestellten clean-up nur geringfügige Interferenzen im Bereich der Totzeit (ca. 2 min) auftreten, zeigt das RP-Verfahren massive Störungen durch nicht abgetrennte Matrix. Des weiteren ist eine leichte Verschiebung der Retentionszeit erkennbar. Wie beim Wein ist das clean-up mit Immunaffinitätssäulen erwartungsgemäß am besten. Die bereits genannten Vorteile des Anionentauscher/RP clean-ups treffen jedoch auch für diese Anwendung zu.

4.4.3 Validierung des Verfahrens

Die Validierung des vorgestellten Verfahrens wurde auf der Grundlage der obigen Vorschrift durchgeführt (vgl. 4.4.2). Mögliche Abweichung sind im folgenden aufgeführt und erläutert. Innerhalb der Validierung wurden ausschließlich dotierte Proben eingesetzt. Dabei wurde vorausgesetzt, dass die Extrahierbarkeit des OTA aus dotierten und natürlich kontaminierten

Bierproben identisch ist. Diese Annahme stützt sich auf Erfahrungen, welche innerhalb der OTA Analytik in Wein gemacht wurden (vgl. 4.3.3.4). In diesem Zusammenhang konnten auch keine signifikanten Unterschiede bei der Ermittlung der Wiederfindung festgestellt werden. Analog zur Bestimmung von OTA in Wein wurden sämtliche Verfahrensmerkmale überprüft.

4.4.3.1 Linearität

Die Linearität wurde mit OTA-Standards überprüft. Die Prüfung erstreckte sich auf einen Konzentrationsbereich von 3,0 µg/kg bis 40 µg/kg. Die Korrelationskoeffizienten lagen innerhalb der Validierung zwischen 0,970 und 0,996.

4.4.3.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die kleinste nachweisbare sowie die kleinste quantifizierbare Menge wurde jeweils mit der Kalibriermethode unter Berücksichtigung eines Anreicherungsfaktors ermittelt (vgl. Gleichung 4.2.). Analog zur Bestimmung der Nachweisgrenze in Wein ergibt sich dieser Faktor aus dem Verhältnis der Masse der eingewogenen Probe und der Masse des Eluates. Für die Bestimmung von OTA in Bier wurde ein Faktor von 20 berücksichtigt. In der folgenden Tabelle sind die berechneten Werte dargestellt:

Tabelle 4.14: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Kalibrierpunkte/Messungen	Nachweisgrenze	Bestimmungsgrenze
6/1	0,2 µg/kg	0,4 µg/kg

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze für OTA in Bier liegt bei jeweils 0,2 µg/kg und 0,4 µg/kg. Diese Werte sind sehr niedrig und mit Ergebnissen aus LC-FLD-Messungen vergleichbar [55]. Mit dieser Methode ist es somit möglich, die geplanten Höchstmengen für

OTA in Bier, welche im unteren ppb Bereich festgelegt werden, zu bestimmen.

4.4.3.3 Präzision

Im Rahmen der Methodenvalidierung wurde die Methodenpräzision durch Mehrfachbestimmung einer Probe mit unabhängigen Einwaagen und eine laborinterne Vergleichspräzision ermittelt. Zur Ermittlung der Präzisionen wurde eine dotierte Bierprobe mit einem OTA-Gehalt von 1,46 µg/kg eingesetzt.

Tabelle 4.15: Methodenpräzision (n=6) und Vergleichspräzision (3 Teilnehmer, n=3)

Parameter	Mittelwert	RSD
Methodenpräzision	1,22 µg/kg	8%
Vergleichspräzision	1,4 µg/kg	10%

Die Methoden- und Vergleichspräzision sind mit jeweils 8% und 10% nahezu identisch und stimmen mit den Präzisionsdaten der Normmethode [55] für das gegebene Konzentrationsniveau überein.

4.4.3.4 Richtigkeit

Im Rahmen der Methodenvalidierung wurde die Richtigkeit des Verfahrens durch Methodenvergleich mit einem modifizierten Standardverfahren, durch Bestimmung der Wiederfindung auf unterschiedlichen Konzentrationsniveaus sowie durch ein Standardadditionsverfahren bestimmt (vgl. 4.3.3.4). Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 4.16: Bestimmung der Richtigkeit (Sollwert: 1,45 µg/kg; n=3)

Methodenvergleich		Mittelwert		RSD
LC-MS/MS	---	1,50 µg/kg	---	11%
DIN EN 14133	---	1,44 µg/kg	---	7%
Wiederfindungen	Theoretischer Gehalt	Mittelwert	Wiederfindung	RSD
Bier _{1+u}	1,46 µg/kg	1,50 µg/kg	103%	11%
Bier _{1+v}	2,87 µg/kg	2,47 µg/kg	86%	15%
Bier _{1+w}	3,78 µg/kg	4,50 µg/kg	119%	11%
Bier _{1+x}	5,56 µg/kg	5,40 µg/kg	97%	6%
Bier _{2+y}	1,25 µg/kg	1,46 µg/kg	116%	3%
Bier _{3+z}	1,17 µg/kg	1,08 µg/kg	92%	---
Standardaddition				
Bier _{1+u}	1,46 µg/kg	1,30 µg/kg	88%	---

Wie bereits bei der Validierung des Verfahrens zur Bestimmung von OTA in Wein (vgl. 4.3.3.4) wurde zur statistischen Ermittlung der Richtigkeit der t-Test herangezogen. Damit konnte die Richtigkeit des vorgestellten Verfahrens bestätigt werden. Das wurde durch die Anwendung der Wiederfindung und des Standardadditionsverfahrens verifiziert.

4.4.3.5 Robustheit

Bei der Ermittlung der Robustheit des Verfahrens wurde die Einwaage sowie die Fällung systematisch variiert und der Einfluss auf die Wiederfindung ermittelt. Zur Abschätzung der genannten Faktoren wurde die gleiche Bierprobe wie im Methodenvergleich verwendet. Außerdem wurde die Anwendbarkeit des Verfahrens auf unterschiedliche Biersorten geprüft. In der folgenden Tabelle sind die genannten Parameter und ihre Auswirkungen auf die Wiederfindung dargestellt.

Tabelle 4.17: Variation der Einwaage und der Klärung

Parameter	Mittelwert	Theoretischer Gehalt	WF	RSD
Einwaage				
10 g	1,50 µg/kg	1,45 µg/kg	103%	11%
15 g	1,22 µg/kg	1,45 µg/kg	84%	4%
20 g	1,53 µg/kg	1,45 µg/kg	105%	9%
Klärung				
Aceton	1,31 µg/kg	1,45 µg/kg	90%	90%
Acetonitril	1,15 µg/kg	1,45 µg/kg	79%	80%
Carrez-Lösung I+II	0,89 µg/kg	1,45 µg/kg	61%	61%

Die Erhöhung der Probeneinwaage um 50% sowie 100% hat nur einen geringen Einfluss auf das Ergebnis. Das bedeutet, dass bei der Ermittlung der Nachweisgrenze ein Anreicherungsfaktor von 20 berücksichtigt werden kann.

Die Klärung der Probe mit Aceton und Acetonitril zeigt ebenfalls nur geringfügige Auswirkungen auf die Wiederfindungen. Bei der Klärung mit Carrez-Lösung hingegen liegt die Wiederfindung bei 60%. Des weiteren konnte im Rahmen der Methodenentwicklung gezeigt werden, dass auch der gewünschte clean-up Effekt ausbleibt (vgl. Abbildung 4.13). Aufgrund der einfacheren Handhabung im Laboralltag und der besseren Wiederfindung wurde Aceton als Fällungsreagenz in die Methode einbezogen.

In Kapitel 4.4.3.4 konnte bereits gezeigt werden, dass die Wiederfindungen für verschiedene Biersorten (Bier_{1, 2, 3}) identisch sind. Außerdem konnte bei der Ermittlung der Robustheit des Verfahrens gezeigt werden, dass auch das clean-up vergleichbar ist. Beispielhaft ist im folgenden das Chromatogramm eines weiteren Bierextraktes dargestellt.

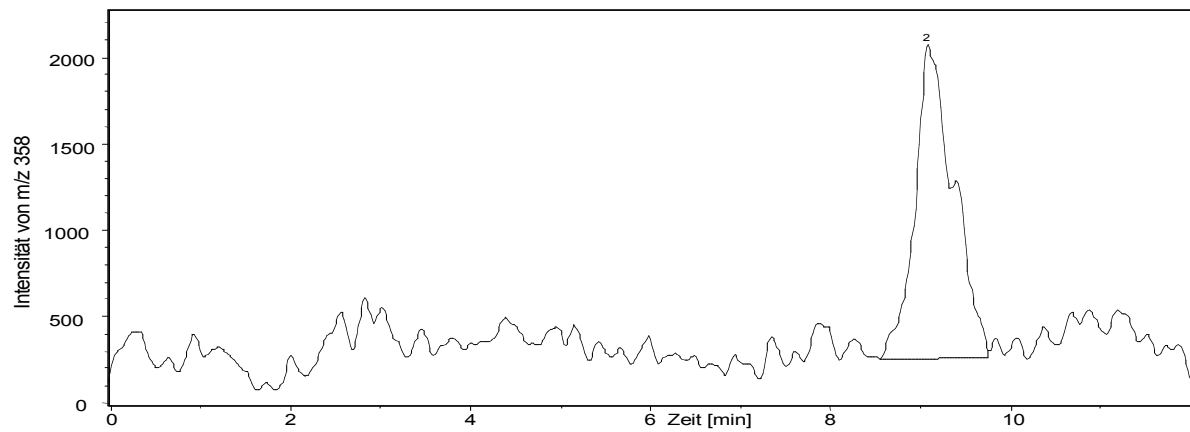


Abbildung 4.15: Chromatogramm eines Bierextraktes (Bier₃)

Die Abbildung zeigt, dass die Detektion des OTA nicht durch Matrixinterferenzen beeinflusst wird. Damit wird die Effektivität des clean-ups und die Robustheit des Verfahrens bestätigt.

4.5 Bestimmung von OTA in Röstkaffee

Das Standardverfahren zur Bestimmung von OTA in Röstkaffee [54] basiert auf der Extraktion des Analyten mittels Horizontalschüttler aus der Probenmatrix, dem clean-up an einer Phenylphase, gefolgt von einem weiteren clean-up an einer Immunaффinitätsphase. Anschließend wird das OTA mittels LC-FLD bestimmt. Die Phenylphase dient zur Abtrennung des Koffeins, welches eine Kreuzreaktivität zu Antikörpern von Immunaффinitätssäulen älterer Generation vorweist. Das führte wiederum zu Minderbefunden. Da die Entwicklung des Standardverfahrens bereits einige Jahre zurückliegt und Immunaффinitätssäulen der heutigen Generation diese Eigenschaft nicht mehr besitzen, sollte auf die Verwendung einer Phenylphase verzichtet werden können. Das sollte durch Bestimmung von Wiederfindungen an dotierten Kaffeeproben bestätigt werden. Parallel dazu wurde die Extraktion am Horizontalschüttler mit effizienteren Verfahren (ASE, Ultraschall) verglichen. Ferner wird das clean-up mit Anionentauscher/Umkehrphasen für die Bestimmung von OTA in Röstkaffee geprüft.

4.5.1 Probenvorbereitung

Die im Rahmen der Methodenentwicklung verwendeten Röstkaffees wurden in lokalen Supermärkten bezogen. Zunächst wurden zehn Packungen á 500 g des bereits gemahlenden Röstkaffees vereinigt und am Rhönradmischer homogenisiert. Anschließend wurde der Blindwert bestimmt. Da keine natürliche Kontamination der Probe nachgewiesen werden konnte, wurde die Methodentwicklung ausschließlich an dotierten Röstkaffees durchgeführt. Dazu musste zunächst die Extrahierbarkeit von OTA aus Röstkaffee geprüft und evtl. Einschlüsse des Mykotoxins in gemahlenden Kaffee ausgeschlossen werden. Diese Untersuchungen wurden im Rahmen eines Homogenitätstest durchgeführt (vgl. 5.2). Durch Kenntnisse bezüglich der Homogenität eines Materials, kann die Streuung innerhalb einer neuen Methode genauer auf die einzelnen Verfahrensschritte zurückgeführt werden.

4.5.2 Methodenentwicklung

4.5.2.1 Optimierung der Extraktionstechniken

Um die Notwendigkeit von Phenylphasen innerhalb der Probenvorbereitung zu prüfen, wurde zunächst nach dem in Abbildung 4.16 dargestellten Protokoll gearbeitet. Parallel dazu wurde das Extraktionsverfahren variiert und verglichen.

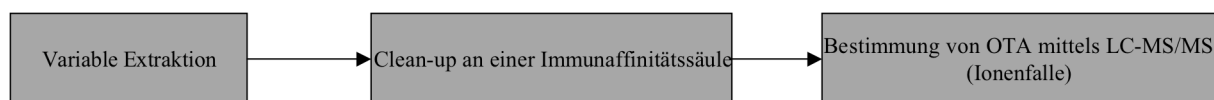


Abbildung 4.16: Verfahrensablauf zum Vergleich von Extraktionstechniken

Es wurden Wiederfindungen an dotiertem Röstkaffee unter Verwendung des Horizontalschüttlers, der Ultraschallextraktion sowie der ASE durchgeführt. Dabei wurde wegen der guten Löslichkeit des OTA eine Mischung aus Methanol und 3% Natriumhydrogencarbonat-Lösung (50/50; v/v) als Extraktionsmittel verwendet (vgl. 3.2.5). Die Extraktionsdauer betrug für die Schüttelextraktion und Ultraschallextraktion 30 min. Die tatsächliche Extraktionszeit bei der ASE betrug 6 min, wobei für einen Gesamtzyklus (Heizen, Extrahieren, Spülen etc.) ca. 25 min kalkuliert werden sollten. Die Probeneinwaage lag bei ca. 5 g. Nach der Extraktion wurden die Extrakte mit PBS-Puffer (vgl. 7.2) verdünnt, so dass der resultierende Anteil des organischen Lösungsmittels unter 5% lag. Dies ist deshalb notwendig, da bereits geringe Anteile organischer Lösungsmittel die Antikörper der Immunaффinitätssäulen denaturieren und die Antigen-Antikörperbindung verhindern (vgl. 3.3.4). Die Elution des Analyten erfolgte durch Denaturierung der Antikörper mit einer Mischung aus Methanol und Eisessig (98/2; v/v). Die Bestimmung des Analyten wurde mittels LC-MS/MS durchgeführt (vgl. 4.2).

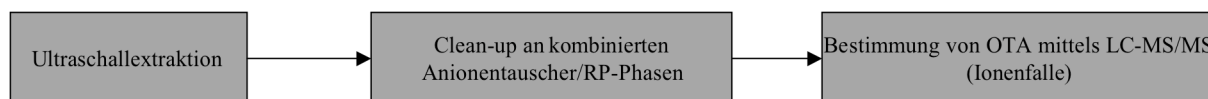
In der folgenden Tabelle sind die verschiedenen Extraktionstechniken und die jeweiligen Wiederfindungen gegenübergestellt.

Tabelle 4.18: Vergleich von Extraktionstechniken (n = 3-6; OTA-Gehalt 5 µg/kg)

Extraktionstechnik	Wiederfindung	RSD
Horizontalschüttler	67%	9%
Ultraschall	92%	12%
ASE	95%	11%

Die Ergebnisse zeigen, dass die Ultraschallextraktion und die ASE der Extraktion am Horizontalschüttler überlegen sind. Das Entfernen der Phenylphase aus dem clean-up zeigt keine Auswirkungen auf die Wiederfindungen. Diese liegen für das gewählte Konzentrationsniveau (5 µg/kg) bei 92% und 95%. Im Vergleich dazu wurden bei der Ermittlung der Präzisionsdaten des Normverfahrens mit 88% geringfügig niedrigere Wiederfindungen und mit 15% höhere Standardabweichungen ermittelt [54]. Diese liegen hier bei 11% bzw. 12%. Aufgrund der sehr guten Wiederfindungen wurde für die weiteren Versuche innerhalb der Methodenentwicklung die Ultraschallextraktion eingesetzt.

Nach der Optimierung des Extraktionsverfahrens sollte die Anwendbarkeit alternativer Festphasen innerhalb der Probenvorbereitung getestet werden. In diesem Zusammenhang galt die größte Aufmerksamkeit der Adaption des für Wein und Bier entwickelten Verfahrens auf die Matrix Röstkaffee. Ferner wurde die Festphasenextraktion an konventionellen C18-Phasen geprüft. Die Vorversuche wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

**Abbildung 4.17: Vorläufiger Verfahrensablauf zur Bestimmung von OTA in Kaffee**

OTA wurde mittels Ultraschall aus dem Kaffee extrahiert (vgl. 4.5.2.1) und an kombinierten Anionentauscher/RP-Phasen gereinigt. Die Bestimmung erfolgte mittels LC-MS/MS an der Ionenfalle. Abbildung 4.18 zeigt, dass die Bestimmung des OTA an der Ionenfalle nicht möglich war. Das für Wein und Bier optimierte MRM Experiment M^3 : 404→358 war für die Kaffeeanalytik zu unspezifisch. Wie aus der Abbildung hervorgeht, wird die Detektion des

OTA durch matrixbedingte Interferenzen gestört. Erst durch Versetzen des Extraktes mit einem OTA-Standard und der damit verbundenen Verdünnung der Matrix (resultierende Konzentration: ca. 15 µg/kg), wird das OTA-Signal sichtbar.

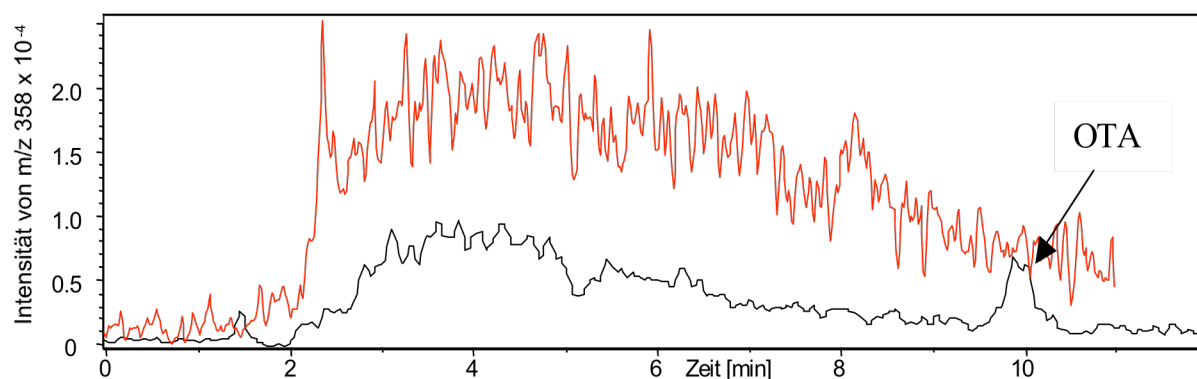


Abbildung 4.18: EIC von m/z 358 eines dotierter Kaffees nach kombinierten clean-up (rot); Probe mit OTA Standard versetzt (schwarz)

Der Versuch, auf einen anderen Übergang (z.B. M^3 : 404→239) auszuweichen, war aufgrund der schlechteren Empfindlichkeit nicht möglich. Somit läßt sich OTA in Röstkaffee mit dem für Wein und Bier vorgestellten Detektionsverfahren (LC-MS/MS-Ionenfalle) nicht bestimmen. Die erforderliche Empfindlichkeit und Spezifität sollte jedoch durch Kopplung der LC mit einem triple stage quadrupol Gerät (TSQ, API 4000) erreicht werden.

4.5.2.2 Bestimmung von OTA mittels LC-MS/MS (TSQ)

Zur Bestimmung von OTA in Kaffee am LC-MS/MS (TSQ) konnten die chromatographischen Parameter adaptiert werden. Die MS/MS-Parameter mußten jedoch erneut optimiert werden [105]. Dazu wurde eine OTA-Lösung (Konzentration ca. 100 ng/g) über eine Spritzenpumpe in das MS eingeleitet und der Q_1 auf „Scan“ eingestellt. Wie bei der Ionenfalle wurde fast ausschließlich die Bildung von $[M+H]^+$ mit m/z 404 festgestellt (Turbo Ion Spray, positive Polarität). Der Anteil an Natriumaddukten war sehr gering. Anschließend wurde durch systematische Variation sämtlicher Spannungen innerhalb der Ionenoptik die

optimalen Werte ermittelt. Weiterhin wurde das Fragment mit der höchsten Intensität und der entsprechenden Kollisionsenergie (CE) bestimmt.

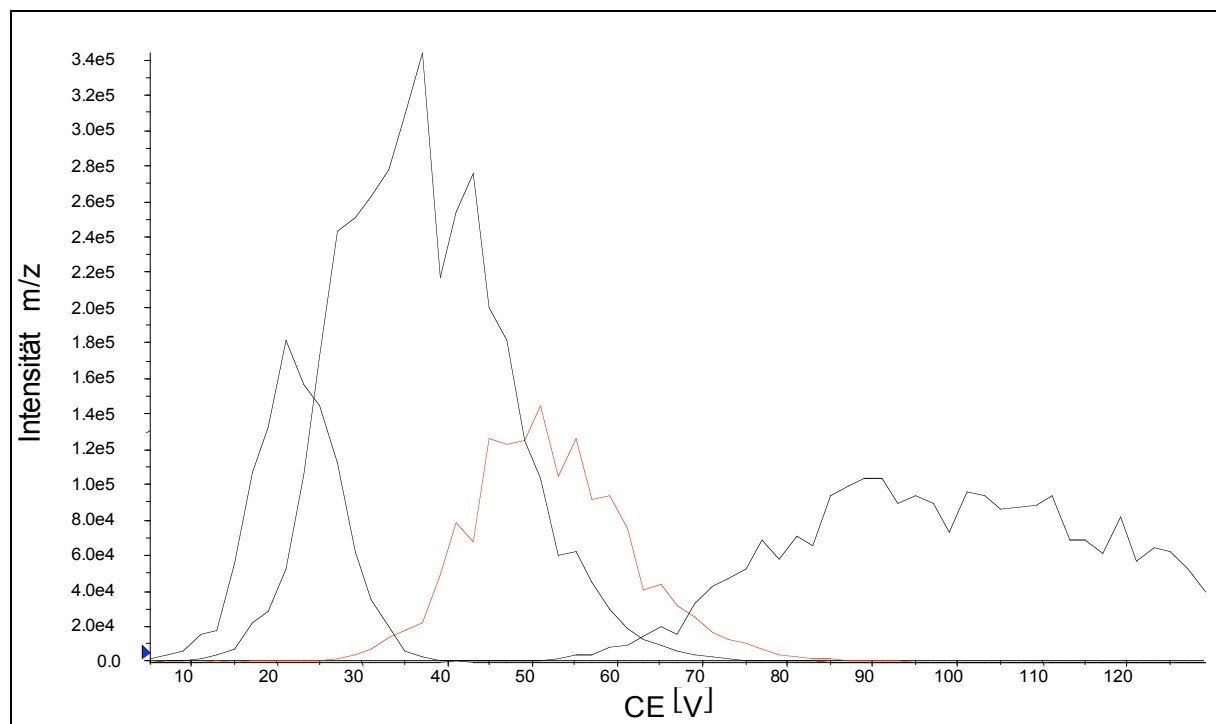


Abbildung 4.19: Optimierung der Kollisionsenergien zur Bestimmung unterschiedlicher Fragmente des OTA am API 4000; für m/z 358 mit 20 V, m/z 239 35 V, m/z 221 mit 50 V, m/z 102 mit 100 V

Im Gegensatz zur Ionenfalle konnte mit dem TSQ eine sehr gute Empfindlichkeit für den Übergang M^3 : 404→239 erreicht werden. Weitere Übergänge, wie z.B. M^3 : 404→358 sind um den Faktor zwei schlechter. Wie an der Ionenfalle, entstehen die Produkt-Ionen mit m/z 358, m/z 239 und m/z 221 jeweils durch Verlust neutraler Moleküle (vgl. 4.2.2). Weitere Produkt-Ionen geringerer Intensität, welche durch die Abspaltung von Wasser ($[M+H-H_2O]^+$) mit m/z 386 sowie Ameisensäure und Ammoniak ($[M+H-HCOOH-NH_3]^+$) mit m/z 341 entstehen, wurden ebenfalls beobachtet. Außerdem konnte die Bildung eines bisher nicht beschriebenen Fragmentes mit m/z 102 beobachtet werden. Anhand dieser Informationen wurden mittels Fließinjektionsanalyse (FIA) die Ionenquellenparameter optimiert. Diese sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 4.19: LC-MS/MS Parameter

mobile Phase	MeOH/H ₂ O/Eisessig (70/30/1,5)
Trennsäule	ODS 3, 250 x 2 mm
Flussrate	0,25 mL/min
Injektionsvolumen	20 µL
Säulentemperatur	45° C
Ionenquelle	TIS
Polarität	Positiv
Kapillarspannung	5.5 kV
Zerstäubergasdruck	30 psi
Trockengasfluss	10 l/min
Trockengastemperatur	650° C
Modus	---
MRM	+MS ³ (404→239)

Zur Bestimmung von OTA am TSQ kann auf mehrere sehr empfindliche Übergänge zurückgegriffen werden. Bei der Auswahl des MRM-Experimentes sollte die jeweilige Spezifität bezogen auf die vorliegende Matrix berücksichtigt werden. Diese kann für unterschiedliche Kaffeesorten und Herstellungsverfahren (rösten) unterschiedlich sein.

Die Ermittlung der optimalen Übergänge wurde anhand eines dotierten Kaffeeextraktes (Konzentration ca. 1 ng/g) überprüft.

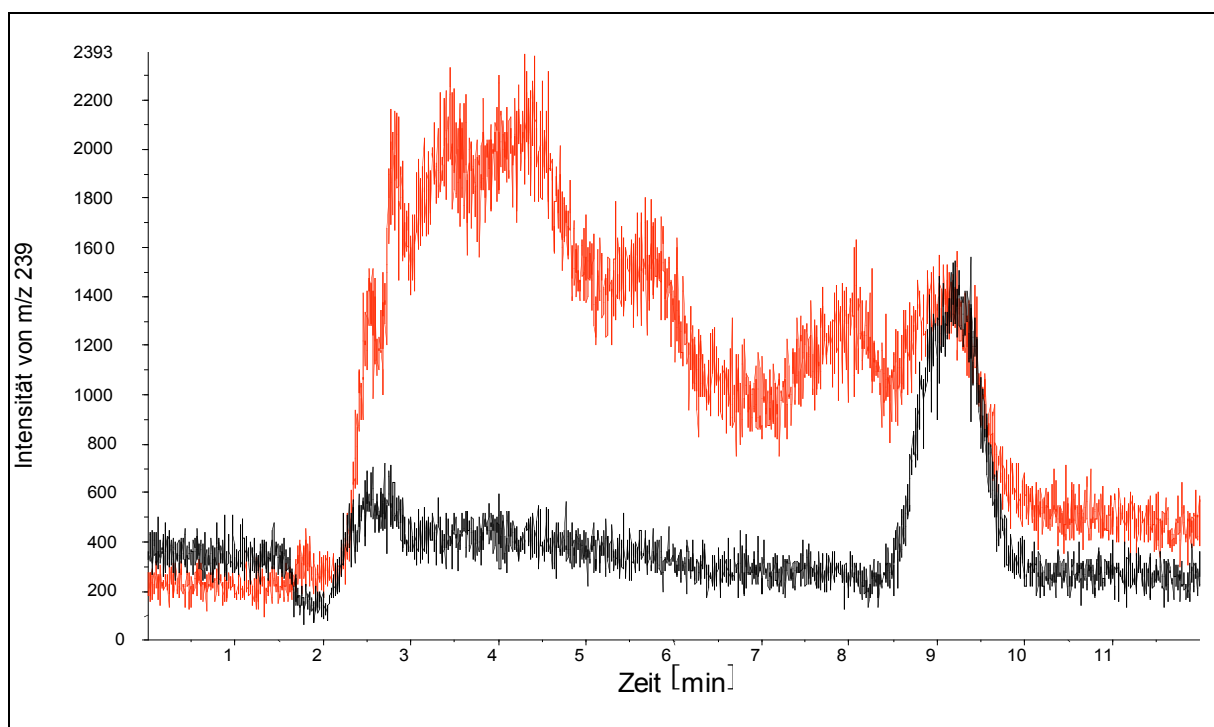


Abbildung 4.20: EIC von m/z 358 (rot) und m/z 239 (schwarz) eines dotierten Kaffeeextraktes

Abbildung 4.20 zeigt die extrahierten Ionenchromatogramme (XIC) der Übergänge M^3 : 404→358 und M^3 : 404→239. Wie an der Ionenfalle ist der Übergang M^3 : 404→358 ungünstig. Das Grundrauschen ist erhöht und es sind zahlreiche Interferenzen sichtbar. Diese wirken sich vor allem auf die Nachweisgrenze aus, was durch Vergleich mit dem Übergang M^3 : 404→239 verdeutlicht wird. Hier ist ein intensives, basisliniengetrenntes OTA Signal bei $R_t = 9$ min sichtbar. Dieser Übergang ist somit sehr spezifisch und wird nicht durch Matrixbestandteile beeinflusst. Lediglich zur Totzeit sind marginale Interferenzen sichtbar.

Unter Berücksichtigung der geringen Konzentration der Probe von 1 $\mu\text{g/kg}$ wird die Empfindlichkeit des Detektionsverfahrens für OTA in Matrix veranschaulicht. Somit ließen sich OTA-Gehalte weit unter dem festgelegten Grenzwert nachweisen (vgl. 3.2.6).

Im nächsten Schritt wurde die Probenvorbereitung optimiert. Als Extraktionstechnik wurde die bereits optimierte Ultraschallextraktion eingesetzt (4.5.2.1). Weiterhin wurde die Säulenfüllung von 30 mg auf 60 mg erhöht und die Säulenkapazität ermittelt. Hiermit sollten in Vorversuchen beobachtete Überladungen der Festphasen vermieden werden. Die Aufarbeitung des Extraktes (Aliquot) wurde in Anlehnung an die Wein- und Biervorschriften

durchgeführt. Die Eluate wurden mittels LC-MS/MS (TSQ) vermessen. Es wurde nach folgendem Versuchsprotokoll gearbeitet:

Vorbereitung der Probe:

10 g gemahlener Röstkaffee wird mit 60 mL Extraktionslösung (MeOH/3% Natriumhydrogencarbonat-Lösung; 50/50) versetzt und 30 Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Dann wird die Lösung über einen Faltenfilter filtriert und die unlöslichen Bestandteile abgetrennt. Ein Aliquot (0,5 mL – 1,5 mL) des Durchlaufs wird mit gleichen Teilen Wasser versetzt und analog der Weinmethode (vgl. 4.3.2) aufgearbeitet.

4.5.3 Validierung des Verfahrens

Die Validierung des vorgestellten Verfahrens wurde auf der Grundlage des zuvor vorgestellten Protokolls durchgeführt. Dabei wurden ausschließlich dotierte Proben eingesetzt. Im Gegensatz zur Bestimmung von OTA in Wein und Bier wurde die Validierung dieses Verfahrens auf die Merkmale Richtigkeit, Linearität und Nachweisgrenze beschränkt. Da zur Detektion ein TSQ- Gerät verwendet wurde, wird die Linearität und daraus abgeleitete Nachweisgrenze ausführlich besprochen. Die Präzisionsdaten werden zusammengefasst dargestellt und kurz diskutiert.

4.5.3.1 Linearität

Die Linearität wurde mit OTA-Standards überprüft. Die Prüfung erstreckte sich auf einen Konzentrationsbereich von 0,05 µg/kg bis 12,0 µg/kg, da die Grenzwerte in diesem Bereich festgelegt sind (vgl. 3.2.6). Die Korrelationskoeffizienten lagen innerhalb der Validierung zwischen 0,9990 und 0,9999 und damit noch besser, als die mit der Ionenfalle ermittelten Werte. Aus Vorversuchen läßt sich ableiten, dass die Linearität des Gerätes wesentlich größer ist. Des weiteren sollte beachtet werden, dass die Konzentration der kleinsten Kalibrierlösung um den Faktor 60 kleiner ist als an der Ionenfalle (vgl. 4.3.3.1).

4.5.3.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die kleinste nachweisbare sowie die kleinste quantifizierbare Menge wurde jeweils mit der Kalibriermethode ermittelt. Da während der Festphasenextraktion das Verhältnis von Aliquot zu Eluat etwa eins betrug, entspricht die Nachweisgrenze der mittels Kalibriergeraden berechneten Werte.

Tabelle 4.20: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Kalibrierpunkte/Messungen	Nachweisgrenze	Bestimmungsgrenze
5/3	0,04 µg/kg	0,14 µg/kg

In Tabelle 4.20 sind die Nachweis- und Bestimmungsgrenze für das TSQ aufgeführt. Die Ergebnisse sind auch ohne vorherige Anreicherung des Analyten wesentlich niedriger als die mit der Ionenfalle erzielten Werte (vgl. 4.3.3.2). Somit lassen sich OTA-Gehalte deutlich unter dem festgelegten Grenzwert bestimmen (vgl. 3.2.6).

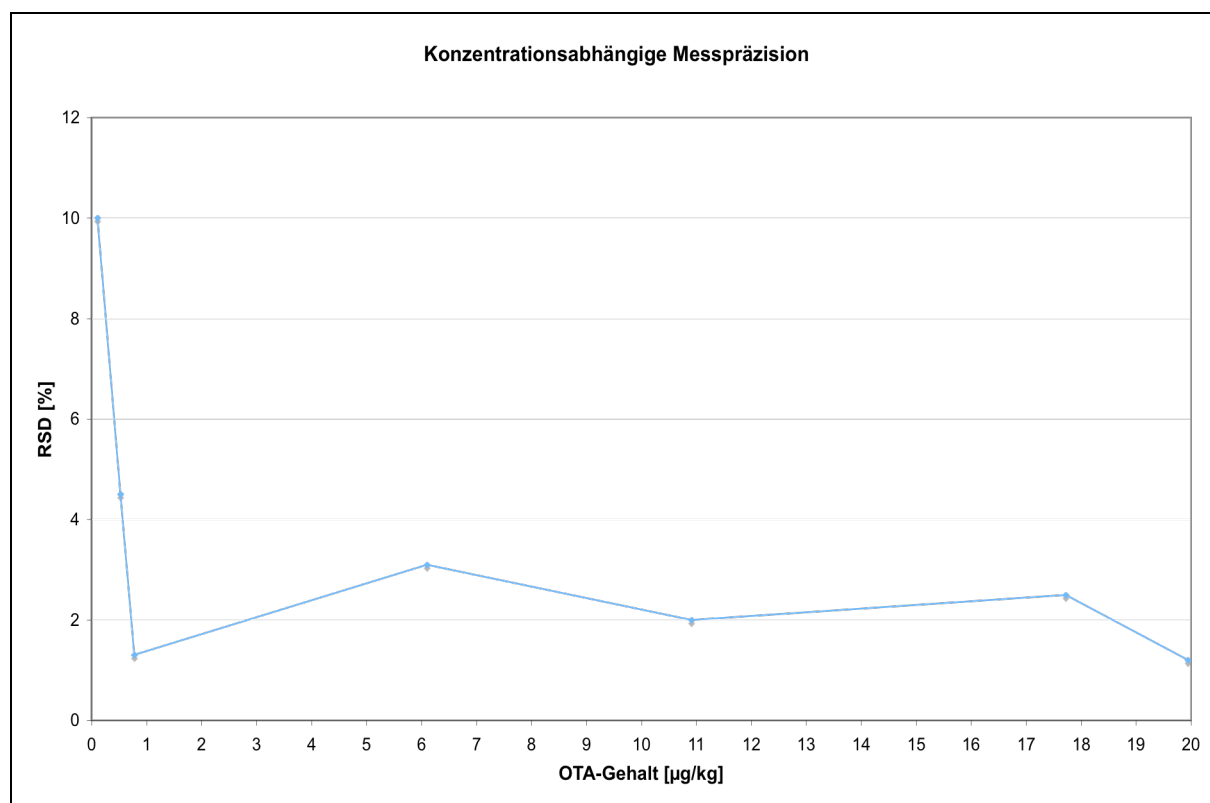
4.5.3.3 Präzision

In der folgenden Tabelle sind die konzentrationsabhängige Messpräzision und die Methodenpräzision des entwickelten Verfahrens dargestellt.

Tabelle 4.21: Mess- und Methodenpräzision

Messpräzision		
Niveaus/Messwerte	Konzentrationsbereich	RSD
7/3	0,11 – 19,94 µg/kg	1% – 9%
Methodenpräzision		
Messwerte	Mittelwert	RSD
3	1,55 µg/kg	7 %
3	2,24 µg/kg	10 %

Die Messpräzision ist konzentrationsabhängig und liegt für kleinere Niveaus bei 9%. Mit steigender Konzentration nimmt die Präzision zu und erreicht ein Minimum bei 1% (vgl. Abbildung 4.21). Unter Berücksichtigung der Konzentrationsniveaus sind diese Ergebnisse signifikant besser als die mit der Ionenfalle erzielten Werte (vgl. 4.3.3.3). Die Standardlösung der geringsten Konzentration ist hier um den Faktor 30 kleiner.

**Abbildung 4.21: Zusammenhang zwischen Messpräzision und Konzentration am TSQ**

Im Rahmen der Methodenvalidierung wurden Extrakte von Proben vermessen, deren Konzentration zwischen 0,1 und 0,5 µg/kg lagen. Der Beitrag der Messpräzision zur Gesamtunsicherheit des Verfahrens liegt somit zwischen 5-9%.

Die Methodenpräzision liegt zwischen 7-10 % und wurde für zwei Konzentrationsniveaus, deutlich unter dem festgelegten Grenzwert bestimmt (vgl. 3.2.6). Wie bei den bereits vorgestellten Verfahren ist diese mit der Präzision standardisierter LC-FLD-Verfahren vergleichbar. Unter Berücksichtigung der Konzentrationen der Extrakte von ca. 0,15 µg/kg ergibt sich der größte Beitrag zur Methodenpräzision aus der Messpräzision. Die Gründe für die gute Methodenpräzision liegen analog der Wein- und Biermethode am äußerst robusten clean-up mit den bereits beschriebenen Vorteilen (vgl. 4.3.3.3).

4.5.3.4 Richtigkeit

In der folgenden Tabelle sind die Wiederfindungsergebnisse für zwei Konzentrationsniveaus dargestellt:

Tabelle 4.22: Bestimmung der Richtigkeit (Sollwert: 2,39 bzw. 3,55 µg/kg)

Verfahrensmerkmal	Mittelwert	WF	RSD
Wiederfindung	1,62 µg/kg	72%	7%
Wiederfindung	2,52 µg/kg	71%	10 %

Anhand der ermittelten Wiederfindung konnte gezeigt werden, dass die vorgestellte Methode auf Kaffee anwendbar ist. Die Wiederfindungen liegen mit jeweils 71% und 72% im geforderten Bereich, der für Ochratoxin A Gehalte in Lebensmitteln zwischen 1-10 µg/kg mit 70% - 110% festgelegt wurde [52].

4.5.3.5 Robustheit

Bei der Ermittlung der Robustheit des Verfahrens zur Bestimmung von OTA in Röstkaffee stand vor allem die Bestimmung der Kapazität der Festphasen im Vordergrund. Da bereits in Vorversuchen eine schnelle Überladung der Festphasen bemerkt wurde, musste die Packung der Säulen von 30 mg auf 60 mg erhöht werden. Zur Bestimmung der Kapazität wurden Kaffeeproben nach der in 4.5.2.2 beschriebenen Methode aufgearbeitet und das OTA mittels LC-MS/MS bestimmt. Dabei wurde das auf die Festphase aufgetragene Aliquot variiert. Anschließend wurde das Kaffee-Sorbens-Verhältnis nach folgender Formel ermittelt:

$$\frac{m_{\text{Kaffee}} \times m_{\text{Aliquot}}}{m_{\text{Extraktionsmittel}} \times m_{\text{Sorbens}}}$$

Gleichung 4.3: Bestimmung der Kapazität der Festphasen

Das ermittelte Kaffee-Sorbens-Verhältnis wurde gegen die Wiederfindung aufgetragen. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in der folgenden Abbildung dargestellt:

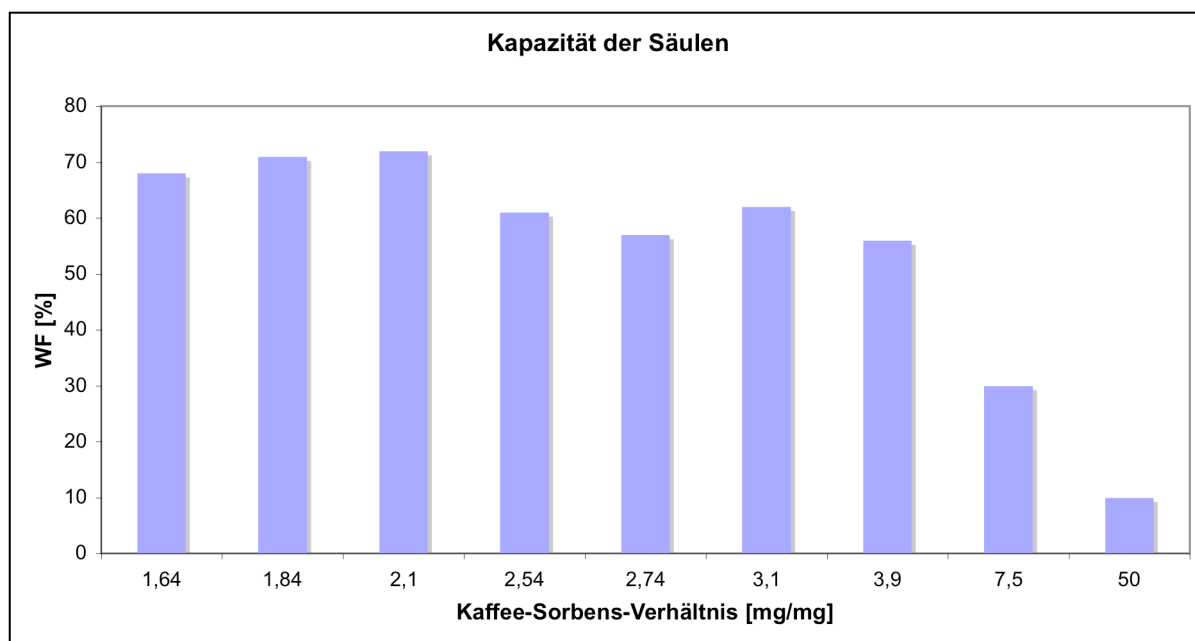


Abbildung 4.22: Bestimmung der Kapazität der Festphasen (60 mg Packung)

Abbildung 4.22 zeigt, dass die Wiederfindungen für hohe Kaffee-Sorbens-Verhältnisse, wie 50 mg/mg, mit 10% sehr schlecht sind. Wird die aufgetragene Kaffeemenge herabgesenkt, so nehmen die Wiederfindungen zu und erreichen für Kaffee-Sorbens-Verhältnisse von 1,64 mg/mg - 2,10 mg/mg mit 72% ein Maximum.

Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass bei einer anspruchsvollen Matrix wie Röstkaffee schnell Überladungen der Festphase durch Matrixinterferenzen auftreten können. Deshalb ist es unerlässlich, die Kapazität der Festphasen zu ermitteln. Um die Wiederfindungen von 71% bzw. 72% zu steigern, müsste das Aliquot des Kaffeeextraktes herabgesenkt oder die Säulenpackung erhöht werden. Dabei müsste zum einen die Bestimmungsgrenze berücksichtigt werden. Zum anderen erfordert die Verwendung größerer Säulenpackungen größere Volumina an Wasch- und Elutionslösungen.

4.6 Anwendbarkeit des Verfahrens auf weitere Matrices

Das für Röstkaffee entwickelte Analysenverfahren sollte noch auf Chili und Weizen angewandt werden (Protokoll s. 4.5.2.2). Bei dem verwendeten Weizen handelt es sich um ein mit OTA kontaminiertes Referenzmaterial (BCR 472) mit einem zertifizierten Gehalt von 8,2 +/- 1,0 µg/kg. Referenzmaterialien können zur Ermittlung der Richtigkeit eines neuen Verfahrens herangezogen werden. Wird mit dem entwickelten Verfahren der zertifizierte Wert im Rahmen seiner Unsicherheit bestätigt, so kann man von der Richtigkeit des Verfahrens ausgehen. Da für die Bestimmung von OTA in Chili weder auf kontaminierte Referenzmaterialien noch auf Methodenvergleiche mit einem Standardverfahren zurückgegriffen werden kann, musste die Richtigkeit des neuen Verfahrens durch Aufstockungen der Probe und Bestimmung der Wiederfindung ermittelt werden. Dazu wurde ein kommerziell erhältliches Chilipulver verwendet.

4.6.1 Bestimmung von OTA in Chili

Da es sich bei Chili um ein fein gemahlenes Pulver getrockneter Chilischoten handelt, konnte auf eine Zerkleinerung verzichtet werden. Das Pulver wurde lediglich gut durchmischt und aufgearbeitet. Im Gegensatz zum Röstkaffee wurde die Probeneinwaage auf 5 g sowie die Menge der Extraktionslösung auf ca. 30 g halbiert. Die Gründe dafür liegen in den wesentlich kleineren Gewürzpackungen, so dass bei drei Einwaagen á 5 g aus einer Gesamteinheit von 50 g eine repräsentative Analyse gegeben ist. Das Verhältnis von aufgetragener Chilimenge zur Säulenpackung lag zwischen 1,2 – 1,8 [mg/mg] (vgl. 4.5.3.5). Die folgende Abbildung zeigt das Chromatogramm eines Extraktes aus Chilischoten nach dem vorgestellten clean up.

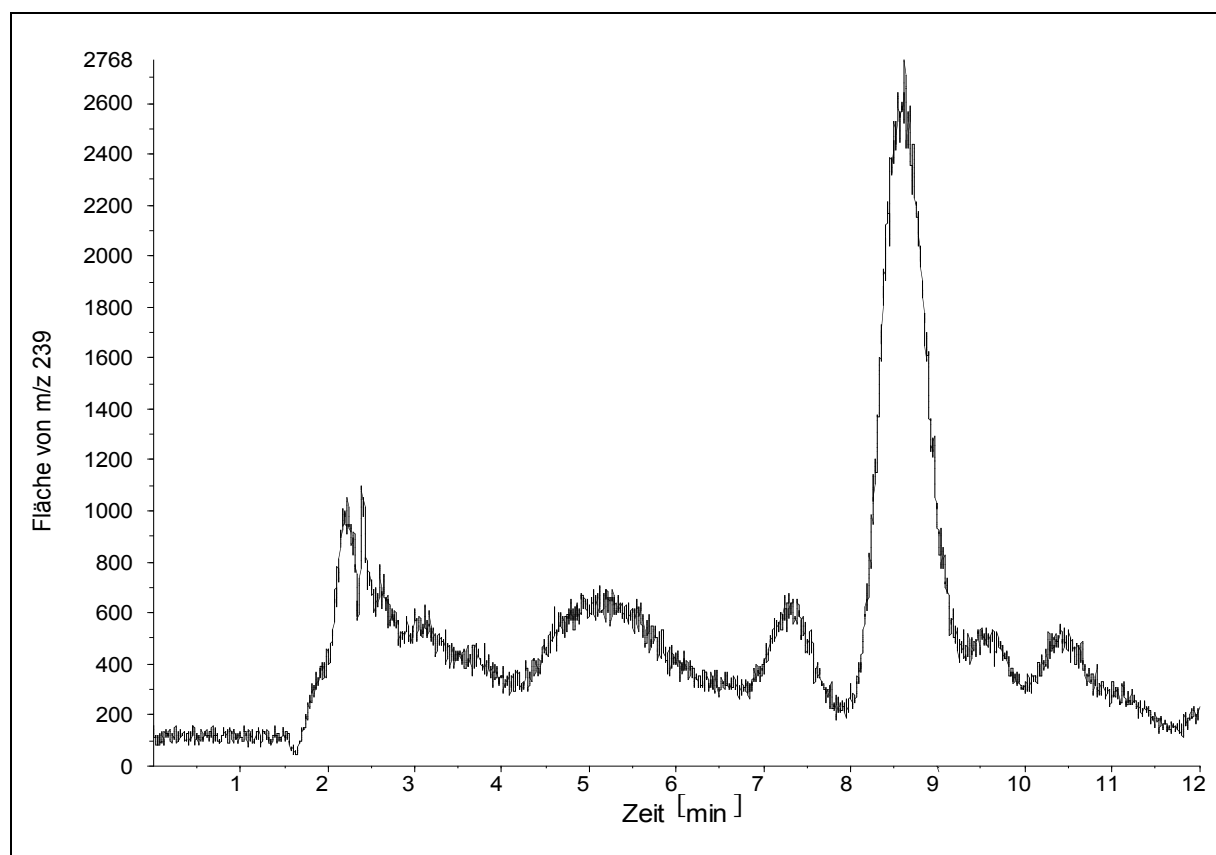


Abbildung 4.23: EIC von m/z 239 eines Chiliextraktes

Die Abbildung zeigt, dass trotz des guten clean-ups und des selektiven Detektionsverfahrens noch immer Matrixinterferenzen im Chromatogramm sichtbar sind. In Kombination mit der Chromatographie des neuen Verfahrens kann das OTA-Signal jedoch basisliniengetrennt werden. Als nächstes wurden potentielle Auswirkung der Matrixinterferenzen auf die Wiederfindung geprüft. Dazu wurde zunächst der natürliche OTA-Gehalt des Chilis mit 7,40 $\mu\text{g/kg}$ (RSD = 7 %) ermittelt. Dann wurde das Chilipulver mit methanolischen OTA-Standards auf zwei Niveaus aufgestockt und die Wiederfindung unter Berücksichtigung des natürlichen OTA-Gehaltes bestimmt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 4.23: Bestimmung von OTA in Chili (n = 3)

Probe	natürlicher OTA Gehalt [$\mu\text{g/kg}$]	zugewetztes OTA [$\mu\text{g/kg}$]	Wiederfindung [$\mu\text{g/kg}$]	Wiederfindung [%]	RSD [%]
Chili _{1+y}	7,40	4,74	8,50	70	10
Chili _{1+z}	7,40	4,03	10,28	93	4

Unter Berücksichtigung des natürlichen sowie zugesetzten OTA-Gehaltes wurden die Wiederfindungen mit 70% sowie 93% ermittelt. Die Interferenzen im Chromatogramm haben somit kaum einen Einfluss auf die Wiederfindungen. Die Variationskoeffizienten wurden mit jeweils 4% und 10% bestimmt. Die ermittelten Verfahrensmerkmale Wiederfindung und Wiederholpräzision stimmen mit den Daten für Wein, Bier und Kaffee überein und bestätigen die Robustheit sowie Universalität des clean-up und Detektionsverfahrens.

4.6.2 Bestimmung von OTA in Weizen

Bei dem verwendeten Weizen handelt es sich um ein mit OTA kontaminiertes Referenzmaterial (BCR 472). Neben der Aufarbeitung gemäß 4.5.2.2 wurde auch die ASE als Extraktionsverfahren getestet, da diese bereits zur Extraktion von Zearalenon aus Weizen angewandt wurde [69]. In diesem Zusammenhang wurden folgende Lösungsmittel getestet:

- Wasser
- Methanol
- Acetonitril
- Methanol/3% Natriumhydrogencarbonat-Lösung (50/50; v/v)

Weiterhin wurden die Parameter Druck und Temperatur variiert, so dass sich folgende Extraktionsprogramme ergaben:

Tabelle 4.24: Extraktion von OTA aus Weizen mittels ASE

Temperatur [° C]	Druck [bar]	Heizen [min]	Spülen [n]
100	150	6	2
40	100	6	2

Aufgrund des hohen Stärkeanteils in der Probe kam es während der Extraktion bei allen verwendeten Extraktionsmitteln und Einwaagen zur Quellung der Probe und Verstopfung der

Extraktionszelle. Auch das Vermischen der Probe mit Seesand führte zu keiner Verbesserung. Inwieweit die ASE zur Extraktion von OTA aus Weizen geeignet ist, müsste in weiteren Versuchen geklärt werden.

Die Bestimmung von OTA im Referenzmaterial wurde nun analog der Kaffeemethode durchgeführt. Das Verhältnis der aufgetragenen Probe zum Sorbens lag zwischen 2,5 - 5 [mg/mg] (vgl. 4.5.3.5). Die Einwaage betrug 10 g. In der folgenden Abbildung ist ein Chromatogramm eines Weizenextraktes dargestellt.

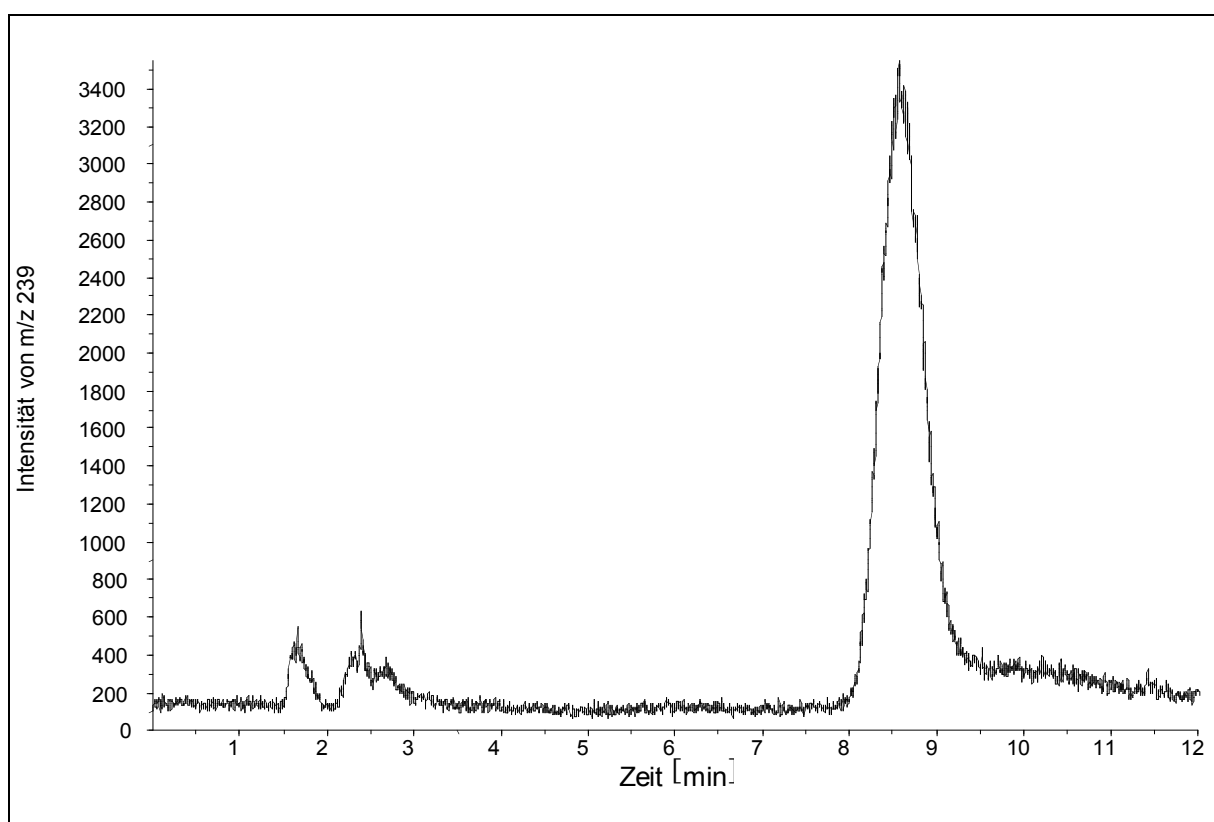


Abbildung 4.24: EIC von m/z 239 eines Weizenextraktes

Wie aus der Abbildung ersichtlich, ist das Chromatogramm frei von Matrixinterferenzen und das OTA-Signal ist basisliniengetreunt. Somit ist die Kombination des vorgestellten clean-ups mit dem Detektionsverfahren auch auf Weizen anwendbar. Die Bestimmung des Referenzwertes ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 4.25: Bestimmung von OTA in Weizen (n = 3)

Probe	Zertifizierter OTA Gehalt [$\mu\text{g/kg}$]	Ermittelter OTA-Gehalt [[$\mu\text{g/kg}$]	RSD [%]
BCR 472	8,2	8,6	58

Mit dem vorgestellten Verfahren konnte ein OTA Gehalt von 8,6 $\mu\text{g/kg}$ ermittelt werden. Die Abweichung zum Referenzwert liegt bei 0,4 $\mu\text{g/kg}$. Der Variationskoeffizient beträgt 58%. Die Gründe für eine derart hohe Abweichung durch statistische Aussagen verifiziert werden. Zusammenfassend kann man jedoch sagen, dass mit dem hier vorgestellte Verfahren OTA in Weizen nachweisbar ist. Abbildung 4.24 zeigt ein von Verunreinigungen freies Chromatogramm und ein basisliniengetrenntes OTA-Signal. Die Richtigkeit des Verfahrens muss in einer umfangreicheren Validierung ermittelt werden.

4.6.3 Validierung der Verfahren

In Kapitel 4.6.1 und 4.6.2 sind bereits die Verfahrensmerkmale Methodenpräzision sowie Wiederfindung aufgeführt. Weitere Präzisionsdaten wie die Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie die Wiederholpräzision sind analog zu den in 4.5.3 dargestellten Ergebnissen.

5 Probenmaterial

5.1 Stabilität von Ochratoxin A in Rotwein

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Stabilität von OTA in Rotwein geprüft [106]. Die eingesetzten Proben wurden durch Dotieren von Rotwein hergestellt. Dazu wurde eine definierte Menge des Mykotoxins einem Rotwein zugefügt und eine Stunde am Horizontalschüttler homogenisiert. Die resultierende Konzentration des OTA im Rotwein lag bei 0,980 µg/g. Die homogenisierte Probe wurde anschließend in 8 mL Vials abgefüllt. Da OTA in geringem Maße in Wasser und somit auch in Rotwein löslich ist, kann bei der vorliegenden Konzentration von einer homogenen Verteilung ausgegangen werden. Aus diesem Grund wurde auf eine Homogenitätsstudie verzichtet. Die Vials wurden bei -20° C, 20° C, 40° C und 60° C eingelagert. Die Bestimmung des Analyten wurde gemäß des hier vorgestellten Versuchsprotokolls durchgeführt (vgl. 4.3.2).

5.1.1 Stabilitätsstudie

Die Stabilitätsprüfung von OTA in Rotwein erfolgte durch analytischen Vergleich der bei -20° C aufbewahrten Probe mit den für 1, 2, 3, 6 und 12 Monate bei Temperaturen von 20° C (Raumtemperatur), 40° C und 60° C gelagerten Proben. Die Untersuchung für Lagerzeiten von 1-6 Monaten erfolgte isochron. Dazu wurden die Proben nach ihrer zeitlich begrenzten Lagerung bei erhöhten Temperaturen wieder bei -20° C eingefroren. Anschließend wurden die Proben innerhalb eines Tages aufgearbeitet und im Vergleich zu einer über den ganzen Zeitraum bei -20° C gelagerten Referenzprobe vermessen [107]. Die für 12 Monate eingelagerten Proben wurden nachträglich vermessen. Es wurden jeweils drei unabhängige Messungen durchgeführt. Während bei -20° C und 20° C bis zum zweiten Monat gelagerten Proben keine sichtbaren Veränderungen auftraten, kam es bei den höher temperierten Proben bereits nach einem Monat zur Bildung eines rotbraunen Niederschlags.

5.1.2 Ergebnisse und Schlussfolgerung

In der folgenden Abbildung ist der Abbau von OTA in Rotwein in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit bezogen auf den Referenzwert dargestellt.

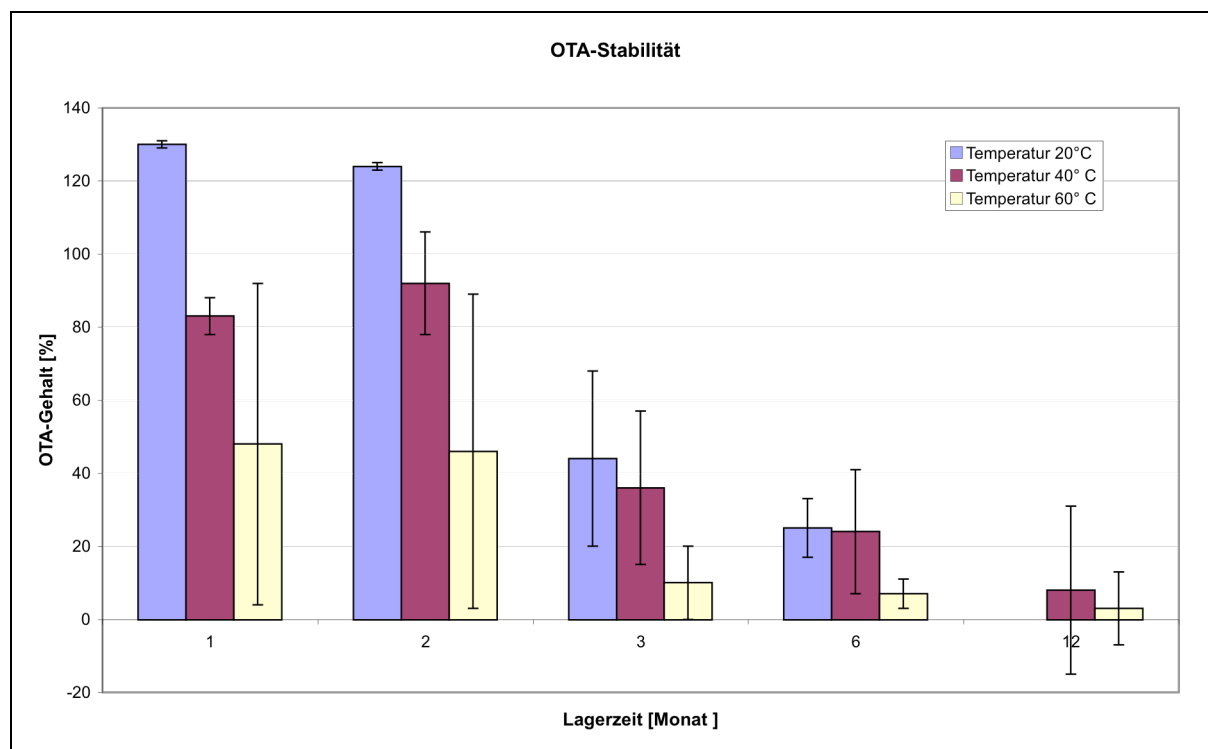


Abbildung 5.1: Abbau von OTA in Rotwein

Wie aus der Abbildung ersichtlich, ist der OTA-Abbau in Rotwein bereits bei 20° C signifikant. Nach drei Monaten sind lediglich 40% des zugesetzten OTA-Gehaltes im Vergleich zum Referenzwert nachweisbar. Nach sechs Monaten sinkt dieser Wert auf etwa 20%. Der Abbau des OTA bei 40° C ist im Verlauf etwas deutlicher und fällt nach sechs monatiger Lagerzeit ebenfalls auf etwa 20%. Die identischen Ergebnisse für die genannten Temperaturen sind vermutlich auf hohe Standardabweichungen zurückzuführen. Diese sind vor allem für ältere oder bei höheren Temperaturen gelagerte Proben wesentlich größer als die innerhalb der Methodvalidierung ermittelten Werte (vgl. 4.3.3.3). Die hohen Standardabweichungen sind auf die Ausbildung eines Niederschlags und somit Inhomogenitäten innerhalb der Probe zurückzuführen. Adsorptionen an der Glaswand der Probenvials sind ebenfalls möglich, wurden aber in diesem Zusammenhang nicht näher

verfolgt. Am deutlichsten ist der Abbau bei 60° C, so dass der OTA-Gehalt nach sechs Monaten bereits unter 10% liegt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Datensätze kann der Abbau durch Exponentialfunktionen veranschaulicht werden. Diese sind in der folgenden Abbildung dargestellt:

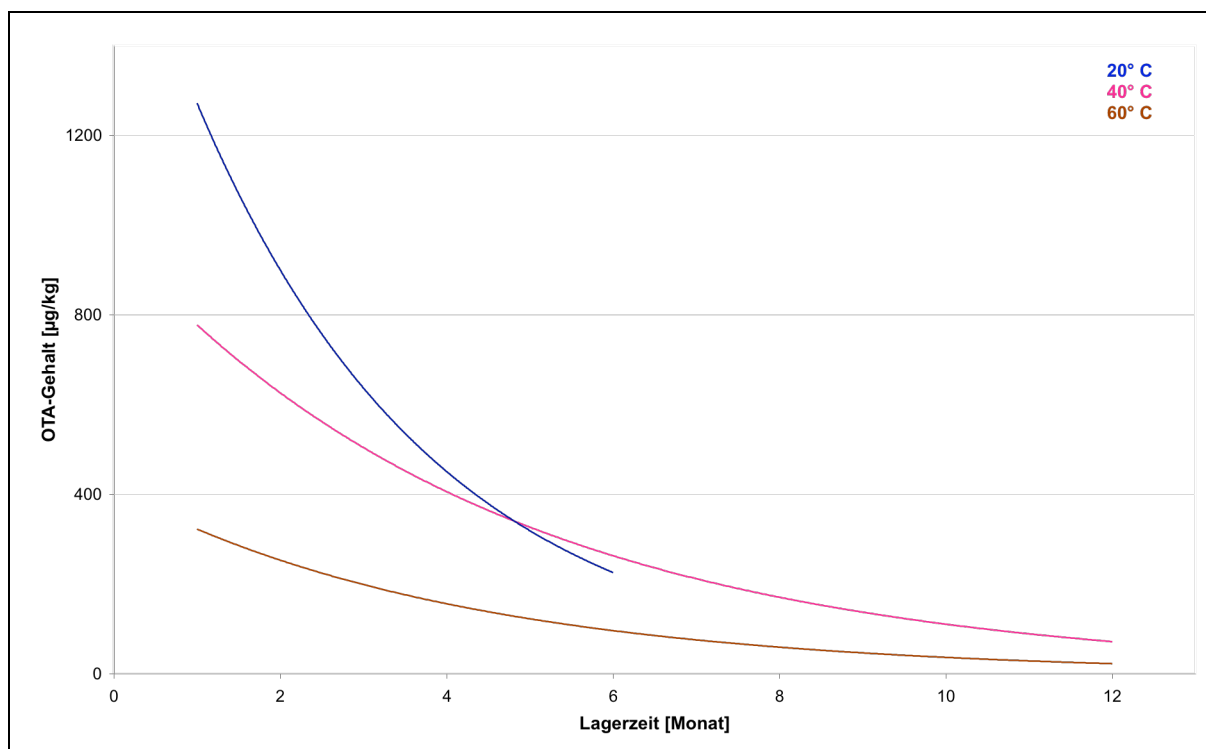


Abbildung 5.2: OTA Abbau als Exponentialfunktion

Aufgrund der rasanten Degradation des OTA nach drei und sechs Monaten der bei 20° C gelagerten Proben, verläuft die entsprechende Exponentialfunktion (blau) ab dem vierten Monat unterhalb der Funktion bei 40° C gelagerter Proben (pink). Das ist ziemlich außergewöhnlich, kann aber durch die hohen Variationskoeffizienten begründet werden. Das Verhalten der Funktionen bei 40° C sowie 60° C (braun) gelagerter Proben zueinander ist wiederum plausibel. Gemäß der Analyseergebnisse ist der Abbau des OTA bei jeder Temperatur signifikant. Die Haltbarkeiten liegen unter zwei Monaten.

Auf die Verwendung von dotierten Weinproben innerhalb der Methodenentwicklung haben diese Ergebnisse keinen Einfluss, da die Proben im Kühlschrank gelagert und nicht länger als eine Woche verwendet wurden. Sofern es möglich war, wurden die Dotierung am Tag der Probenaufarbeitung durchgeführt.

5.2 Homogenität von Ochratoxin A in Röstkaffee

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde die Extraktion aus Röstkaffee und die Homogenität von OTA in dotiertem Röstkaffee geprüft. Dazu wurde der gemahlene Röstkaffee nach folgendem Protokoll aufgearbeitet: Zunächst wurden 400 g Röstkaffee in 1 L methanolischer OTA-Lösung durch Schütteln am Horizontalschüttler aufgeschlemmt (12 h). Anschließend erfolgte das Abziehen des Methanols am Rotationsverdampfer. Der dotierte Kaffee wurde bis zur Massenkonstanz luftgetrocknet. Davon wurden 300 g mit 1200 g unbelastetem Kaffee versetzt und 24 h am Rhönradmischer homogenisiert. Der vorhomogenisierte Kaffee wurde einer Siebfractionierung unterzogen, um die weitere Vorgehensweise bei der Bestimmung der Homogenität festzulegen. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurde der Kaffee am rotierenden Probenteiler (Cross Riffing) auf 20 Flaschen konfektioniert. Die Bestimmung von OTA in den Teilproben wurde nach der Versuchsvorschrift gemäß Abbildung 4.17 durchgeführt. Auf Grund der hohen Probenanzahl wurde anstatt der Ultraschallextraktion die ASE eingesetzt. Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit Excel[®] durchgeführt.

5.2.1 Siebfractionierung

Zur Siebfractionierung wurden 270 g Kaffee eingesetzt. Eine Abtrennung grober Bestandteile war nicht nötig, da der Kaffee bereits gemahlen war. Die Ergebnisse der Fractionierung sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 5.1: Korngrößen und Massenanteile des siebfraktionierten Röstkaffees

Korngrößen [mm]	Masse [g]	Relativer Anteil [%]
< 0,063	n.n.	n.n.
0,063-0,125	n.n.	n.n.
0,125-0,250	30,1	12
0,250-0,500	117,7	47
0,500-1,000	101,8	41
Summe	249,6	100

Tabelle 5.1 zeigt, dass 88% des Kaffees eine Korngröße im Bereich von 0,250-1,000 mm vorweist. Desweiteren entfallen 12% auf die Siebfraktion 0,125-0,250 mm. Der Verlust an Röstkaffee nach Fraktionierung beträgt 7,7%.

5.2.2 Bestimmung der OTA-Gehalte in den Siebfraktionen

Zunächst wurde der OTA-Gehalt in den einzelnen Siebfraktionen bestimmt. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle dargestellt.

Tabelle 5.2: OTA-Gehalte in einzelnen Siebfraktionen (Sollwert = 86 µg/kg; n = 3)

Fraktion	OTA-Gehalt [µg/kg]	RSD [%]
0,125-0,250	58,5	6
0,250-0,500	57,0	9
0,500-1,000	44,6	6

Erwartungsgemäß ist der OTA-Gehalt in der Siebfraktion mit kleinster Korngröße am höchsten und nimmt mit steigender Korngröße ab. Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant, so dass die Auswahl der Siebfraktionen kaum einen Einfluss auf die Homogenität haben sollte. Deshalb wurden zur Konfektionierung am rotierenden Probenteiler der gesamte Materialansatz verwendet und auf 20 Flaschen verteilt. Diese Ergebnisse sollte vor allem bei

der Herstellung eines Referenzmaterials berücksichtigt werden. Die Ermittlung des OTA-Gehaltes erfolgte gemäß des in Abbildung 4.17 vorgestellten Verfahrensablauf.

5.2.3 Bestimmung der Homogenität und Extrahierbarkeit von OTA in Röstkaffee

Die Prüfung auf Homogenität und Extrahierbarkeit des Materials erfolgte durch Bestimmung des OTA in vier willkürlich gewählten Proben (Nr. 1, 5, 15, 20). Das entspricht einem Anteil von 20% und ist für die Größe der Gesamteinheit ($n = 20$) ausreichend [108]. Von jeder Probe wurden vier unabhängige Gehaltsbestimmungen unter Wiederholbedingungen durchgeführt [109]. Nach der Homogenitätsstudie wurden die Proben bei -20°C und 4°C eingelagert.

In Tabelle 5.3 sind die analytisch ermittelten Größen und ihre Varianzen zusammengefasst. Die Mittelwerte liegen zwischen $71\text{ }\mu\text{g/kg}$ und $82\text{ }\mu\text{g/kg}$. Bezogen auf die zugesetzte OTA-Menge von $86\text{ }\mu\text{g/kg}$ ergeben sich Wiederfindungen zwischen 82% und 94%. Diese Ergebnisse bestätigen die hohen Wiederfindungen aus dem Vergleich der Extraktionstechniken innerhalb der Methodenentwicklung (vgl. 4.5.2.1). Somit konnte gezeigt werden, dass OTA aus dotierten Kaffeeproben extrahiert werden kann. Aufgrund der hohen Wiederfindungen können Einschlüsse des Mykotoxins im gemahlene Röstkaffee ausgeschlossen werden.

Tabelle 5.3: Zusammenfassung der Mittelwerte und Varianzen (Soll: $86\text{ }\mu\text{g/kg}$)

Gruppen	Anzahl	Summe [$\mu\text{g/kg}$]	Mittelwert [$\mu\text{g/kg}$]	Varianz
Probe 1	4	282,7	70,7	73,0
Probe 5	4	326,5	81,6	44,1
Probe 15	4	297,7	74,4	37,5
Probe 20	4	296,0	74,0	49,7

Um Aussagen über mögliche Inhomogenitäten innerhalb des Materials treffen zu können, wird die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.4 dargestellt.

Tabelle 5.4: Einfaktorielle Varianzanalyse

Streuungs- ursache	Quadrat- summen	Freiheits- grade	Mittlere Quadratsumme	Prüf- größe	P-Wert	Kritischer F-Wert
Unterschiede zwischen den Gruppen	255,5	3	85,2	1,67	0,23	3,49
Unterschiede innerhalb der Gruppen	612,8	12	51,1			
Gesamt	868,8	15				

Da die ermittelte Prüfgröße (1,67) unter dem kritischen F-Wert (3,49) liegt, ist das hergestellte Material im Rahmen der Methodenstreuung homogen.

Die Ergebnisse können auch bei der Herstellung eines Referenzmaterials berücksichtigt werden. Dabei wird empfohlen, eine möglichst große Menge Kaffee mit OTA zu dotieren und diese anschließend im Rhönradmischer zu verschneiden. Das Verhältnis von dotiertem Kaffee und zugesetztem, OTA freien Kaffee, sollte nicht zu groß gewählt werden. Aufgrund des Mangels ergänzender empirischer Literaturdaten wird das Einhalten des hier ermittelten Verhältnisses von 1:4 empfohlen (vgl. 5.2). Zur Konfektionierung kann der gesamte Ansatz verwendet werden. Eine Siebfraktionierung ist aufgrund unsignifikanter Abweichungen bei der Gehaltsbestimmung des OTA nicht notwendig (vgl. 5.2.2). Des weiteren sollte der Kaffee derartig dotiert und verschnitten werden, dass die OTA Konzentration im Bereich des zugelassenen Höchstwertes von 5 µg/kg liegt (vgl. 3.2.6).

6 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass während der Probenvorbereitung zur Bestimmung von OTA in Lebensmitteln, auf Immunaффinitätssäulen verzichtet werden kann. Das gelingt durch die Kombination des hier vorgestellten clean-ups und der LC-MS/MS Kopplung. Ebenso konnte die Variabilität des Verfahrens gezeigt werden. So ist dieses Verfahren auf flüssige und feste Lebensmittel wie Wein, Bier, Röstkaffee und Chili anwendbar. Weiterhin ist es möglich, OTA in Weizen zu bestimmen, dass als Lebens- oder auch Futtermittel in den Verkehr gebracht wird. Somit kann, im Gegensatz zu Standardverfahren, mit einem Verfahren eine Vielzahl unterschiedlicher Matrices bearbeitet werden.

Die Verfahren zur Bestimmung von OTA in Bier und Wein wurden vollständig validiert. Die ermittelten Präzisionsdaten sind vergleichbar mit dem Standardverfahren. Durch Adaption der Methode auf das zum Ende dieser Arbeit benutzte API 4000 ließen sich Präzision und Nachweisgrenze sogar noch steigern. Damit sind die wichtigsten Merkmale innerhalb der Rückstandsanalytik deutlich besser als die mit LC-FLD erzielten Ergebnisse. Die Bestimmungsgrenzen liegen dennoch weit unter den festgelegten Höchstwerten.

Die Bestimmung von OTA in Röstkaffee, Chili und Weizen liefert ebenfalls reproduzierbare Ergebnisse. Durch den Einsatz eines TSQ-Massenspektrometers konnten die Bestimmungsgrenzen im Vergleich zur Ionenfalle nochmals gesteigert werden. In Folge dessen ist auch die Wiederholpräzision verbessert und ließe sich lediglich durch Verwendung von Isotopen-Standards optimieren. Diese können jedoch noch nicht kommerziell bezogen werden, da Synthesevorschläge und Anwendungen erst kürzlich publiziert wurden [110, 111]. Die Methode zur Bestimmung von OTA in Chili soll zur Entwicklung eines Standardverfahrens für OTA in Gewürzen beitragen, welches momentan vom Normausschuss „Gewürze und Gewürzmittel“ diskutiert wird. Die Vorteile der hier vorgestellten Verfahren liegen in der Robustheit der verwendeten Festphasen, die Fehler in der Anwendung, wie unzureichende Konditionierung oder auch kurzzeitig zu hohe Tropfgeschwindigkeiten verzeiht. Außerdem konnte die Probenvorbereitung durch die Entwicklung eines effizienten clean-ups verbessert werden. Das für Kaffee entwickelte Verfahren ist nun wesentlich schneller durchführbar als das Standardverfahren, da ein Festphasenextraktionsschritt entfällt.

Innerhalb des Homogenitätstest konnte gezeigt werden, dass durch Dotierung mit OTA und Verschnitt ein homogen belasteter Röstkaffee hergestellt werden kann. Gleichzeitig wurde die

Extrahierbarkeit von OTA aus Röstkaffee bestätigt. Somit war das dotierte Material besser für die Methodenentwicklung geeignet, als natürlich kontaminierte Proben, wo Inhomogenitäten aufgrund von „Nesterbildungen“ auftreten.

Im Rahmen eines Stabilitätstest von OTA in Rotwein konnte eine temperaturabhängige Instabilität des Toxins festgestellt werden. Diese läßt sich auch auf Bier übertragen, da die Degradation von OTA in Bier bereits innerhalb des Herstellungsprozesses dokumentiert ist (vgl. 3.2.1). Auf die Ergebnisse der Methodenentwicklung hat die Instabilität jedoch keinen Einfluss.

Weiterhin sollte bei der Herstellung von OTA-Standardlösungen das gravimetrische Verfahren der indirekten photometrischen Bestimmung vorgezogen werden. Somit ließen sich Ungenauigkeiten von bis zu 20% vermeiden (vgl. 4.1.1).

7 Anhang

7.1 Instrumentelle Ausstattung

7.1.1 LC-MS/MS Systeme

LC-UV

LC-System:	Gynkotek
Degasser:	Degasis DG 1320
Pumpe:	High Precision Model 480
Autosampler:	Liquid Sampler A 2000 SE CTC Analytics
Säulenofen:	Jones Chromatography Model 7971
DAD:	UVD 320 S
Säulen:	Inertsil ODS 3 250 x 3 mm/250 x 2 mm, 5 µm (VDS Optilab, Berlin); Polymerphase C18 250 x 4,6 mm, 5 µm (Advanced Separation Technologies Inc.)

LC-MS/MS (Ionenfalle):

LC System:	Agilent 1100
Degasser:	G1379A
Pumpe:	G1312A
Autosampler:	G1329A
Säulenofen:	G1316A
DAD:	G1315B
Säulen:	Inertsil ODS 3 250 x 2 mm, 5 µm (VDS Optilab, Berlin);
MS System:	Agilent MSD XCT
Ionisation:	ESI
Analysator:	Ionenfalle
Auswerteinheit:	PC mit „Data Analysis“ Software (Fa. Agilent/Bruker)

LC-MS/MS (TSQ):

LC System:	Agilent 1100
Degasser:	G1379A
Pumpe:	G1312A
Autosampler:	G1329A
Thermostat:	G1330B
Säulenofen:	G1316A
DAD:	G1315B
FLD:	G1321A
Säulen:	Inertsil ODS 3 250 x 2 mm, 5 µm (VDS Optilab, Berlin)
MS System:	Applied Biosystems MDS SCIEX API 4000
Ionisation:	TIS (Turbo Ion Spray)
Analysator:	Triple Stage Quadrupol
Auswertereinheit:	PC mit „Analyst 1.4“ Software (Fa. Applied Biosystems MDS SCIEX)

7.1.2 Extraktionsgeräte

ASE:	ASE TM 200 (Fa. Dionex)
Ultraschallgerät:	Sonorex (Fa. Bandeline)
Horizontalschüttler:	KS 501 digital (Fa. IKA Labortechnik)

7.1.3 Weitere Laborgeräte

Analysenwaage:	YDP 03-OCE (Fa. Satorius)
Mikrowaage:	UMT2 (Fa. Mettler Toledo)
Labor pH-Meter:	TM 39 (Fa. Meinsberg)
Laborzentrifuge:	MLW T54
Rotationsverdampfer:	Laborota 4003 (Fa. Heidolph)
Pipetten:	Eppendorf 10-100 µL, 100-1000 µL, Vollpipetten 10 mL, 20 mL, 50 mL

7.2 Materialien und Chemikalien

OTA	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Methanol	J.T. Baker (Griesheim, Deutschland)
Aceton	J.T. Baker (Griesheim, Deutschland)
Acetonitril	J.T. Baker (Griesheim, Deutschland)
Eisessig	J.T. Baker (Phillipsburg, USA)
Salzsäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniak	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Oasis MAX	Waters (Eschborn, Deutschland)
Supelco ENVI C18	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Kaliumhexacyanoferrat (II)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Zinkacetat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ochraprep [®] /IA-Säulen	Coring System Diagnostics (Gernsheim, Deutschland)
Ochrastar [®] COIAC 2000	Coring System Diagnostics (Gernsheim, Deutschland)
L-Phenylalanin	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Cumarin	Acros Organics (New Jersey, USA)
Polyethylenglycol (M = 8000)	Fluka (Buchs, Schweiz)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Wasser (für HPLC)	Millipore Inc. (≈ 18 MΩ)
PBS-Puffer	8 g NaCl, 1,2 g di-NaHPO ₄ , 0,2 g KH ₂ PO ₄ und 0,2 g KCl in 1 L Wasser gelöst. Der pH-Wert sollte mit 0,1 M NaOH auf 7,4 eingestellt werden.
Carrez-Lösung I	150 g Kaliumhexacyanoferrat (II) auf 1000 ml Wasser
Carrez-Lösung II	230 g Zinkacetat auf 1000 mL Wasser
1% Essigsäure	1 mL Eisessig auf 100 mL Wasser
0,1% wässrige Salzsäure	
0,1% methanolische Salzsäure	
0,1% Ammoniaklösung	

Waschlösung III (vgl. 4.3.2) 60 mL 0,1% wässrige Salzsäure und 40 mL 0,1%
methanolische Salzsäure

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Struktur von OTA	16
Abbildung 3.2: Biosynthese von OT β	18
Abbildung 3.3: Biosynthese von OTA	18
Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Festphasenextraktion	25
Abbildung 3.5: Prinzip einer Immunaффinitätssäule	26
Abbildung 3.6: Mechanismus des kombinierten Anionentauscher/RP clean-up	27
Abbildung 3.7: Der ESI-Prozess	29
Abbildung 4.1: EIC von $[M+H]^+ = 404$ (schwarz) und $[M+H]^+ = 360$ (rot)	35
Abbildung 4.2: Decarboxylierung von OTA	36
Abbildung 4.3: ^1H -NMR von OTA in Methanol- d_4	37
Abbildung 4.4: Fragmente von m/z 404 ($[M+H]^+$)	41
Abbildung 4.5: Optimierung des clean-ups durch Erhöhung des Methanolanteils	44
Abbildung 4.6: Optimierung des dritten Waschschrirres	45
Abbildung 4.7: Chromatogramme von Glühweinextrakten nach unterschiedlicher Aufarbeitung	47
Abbildung 4.8: Linearität von OTA Standardlösungen	49
Abbildung 4.9: Zusammenhang zwischen Messpräzision und Konzentration an einer Ionenfalle	51
Abbildung 4.10: Bestimmung von OTA in Glühwein mittels Standardadditionsverfahren	54
Abbildung 4.11: Zusammenhang zwischen pH-Wert und Wiederfindung	56
Abbildung 4.12: Chromatogramm eines Bierextraktes nach Anionentauscher/RP clean-up; MRM von m/z 358	58
Abbildung 4.13: Vergleich von Fällungsreagenzien	60
Abbildung 4.14: OTA in Bier nach verschiedenen clean-up Verfahren	62
Abbildung 4.15: Chromatogramm eines Bierextraktes (Bier $_3$)	67
Abbildung 4.16: Verfahrensablauf zum Vergleich von Extraktionstechniken	69
Abbildung 4.17: Vorläufiger Verfahrensablauf zur Bestimmung von OTA in Kaffee	70
Abbildung 4.18: EIC von m/z 358 eines dotierter Kaffees nach kombinierten clean-up (rot); Probe mit OTA Standard versetzt (schwarz)	71
Abbildung 4.19: Optimierung der Kollisionsenergien zur Bestimmung unterschiedlicher Fragmente des OTA am API 4000; für m/z 358 mit 20 V, m/z 239 35 V, m/z 221 mit 50 V, m/z 102 mit 100 V	72
Abbildung 4.20: EIC von m/z 358 (rot) und m/z 239 (schwarz) eines dotierten Kaffeeextraktes	74
Abbildung 4.21: Zusammenhang zwischen Messpräzision und Konzentration am TSQ	77
Abbildung 4.22: Bestimmung der Kapazität der Festphasen (60 mg Packung)	79
Abbildung 4.23: EIC von m/z 239 eines Chiliextraktes	82
Abbildung 4.24: EIC von m/z 239 eines Weizenextraktes	84
Abbildung 5.1: Abbau von OTA in Rotwein	87
Abbildung 5.2: OTA Abbau als Exponentialfunktion	88

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Höchstgrenzen für OTA in verschiedenen Lebensmitteln	20
Tabelle 3.2: Methoden zur Bestimmung von OTA in unterschiedlichen Matrices	22
Tabelle 4.1: Vergleich zwischen Gravimetrie und Photometrie	34
Tabelle 4.2: OTA-Abbau in Standardlösungen (n = 4-6)	36
Tabelle 4.3: Auswertung des ¹ H-NMR von OTA; s (Singulett), d (Duplett), m (Multiplett), dd (Duplett vom Duplett)	38
Tabelle 4.4: HPLC-Parameter	40
Tabelle 4.5: Optimierte massenspektrometrische Parameter	42
Tabelle 4.6: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	50
Tabelle 4.7: Messpräzision	51
Tabelle 4.8: Methodenpräzision	52
Tabelle 4.9: Vergleichspräzision; n=3	52
Tabelle 4.10: Soll/Ist-Vergleich mit modifiziertem Standardverfahren (n = 6)	53
Tabelle 4.11: Wiederfindungen von OTA in Rot- und Glühweinproben (n = 3; u, v, w, x, y, z = zugesetzte OTA Mengen)	53
Tabelle 4.12: Variation der Einwaage (n=3)	55
Tabelle 4.13: Verdünnung der Weinprobe mit Wasser (n=3)	57
Tabelle 4.14: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	63
Tabelle 4.15: Methodenpräzision (n=6) und Vergleichspräzision (3 Teilnehmer, n=3)	64
Tabelle 4.16: Bestimmung der Richtigkeit (Sollwert: 1,45 µg/kg; n=3)	65
Tabelle 4.17: Variation der Einwaage und der Klärung	66
Tabelle 4.18: Vergleich von Extraktionstechniken (n = 3-6; OTA-Gehalt 5 µg/kg)	70
Tabelle 4.19: LC-MS/MS Parameter	73
Tabelle 4.20: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	76
Tabelle 4.21: Mess- und Methodenpräzision	77
Tabelle 4.22: Bestimmung der Richtigkeit (Sollwert: 2,39 bzw. 3,55 µg/kg)	78
Tabelle 4.23: Bestimmung von OTA in Chili (n = 3)	82
Tabelle 4.24: Extraktion von OTA aus Weizen mittels ASE	83
Tabelle 4.25: Bestimmung von OTA in Weizen (n = 3)	85
Tabelle 5.1: Korngrößen und Massenanteile des siebfractionierten Röstkaffees	90
Tabelle 5.2: OTA-Gehalte in einzelnen Siebfractionen (Sollwert = 86 µg/kg; n = 3)	90
Tabelle 5.3: Zusammenfassung der Mittelwerte und Varianzen (Soll: 86 µg/kg)	91
Tabelle 5.4: Einfaktorielle Varianzanalyse	92

10 Gleichungen

Gleichung 4.1: Berechnung der OTA-Konzentration	34
Gleichung 4.2: Berechnung der Nachweisgrenze in Rot- und Glühwein	50
Gleichung 4.3: Bestimmung der Kapazität der Festphasen	79

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Martin Reinsch
Geburtsdatum 05.02.1974
Geburtsort Allenstein in Polen
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

1981 – 1985 Grundschule Wiesenschule und Grundschule Am Ziesberg in
Salzgitter-Bad
1985 – 1987 Orientierungsstufe Am Eikel in Salzgitter-Bad
1987 – 1994 Gymnasium Salzgitter-Bad, Abschluss: Abitur

Zivildienst

10/1994 – 10/1995 Johanniter-Unfall-Hilfe in Salzgitter-Bad

Arbeitstätigkeit

11/1995 – 03/1996 Produktionshelfer bei der Bosch Telecom GmbH

Hochschulstudium

04/1996 – 10/2000 Studium der Lebensmittelchemie an der TU Braunschweig,
Abschluss: 1. Staatsexamen nach 9 Semestern

Wissenschaftliche Abschlussarbeit

07/2000 – 10/2000 "Bestimmung von kationischen Stärken und kationischen
Alkylpolyglycosiden mittels Kapillarelektrophorese"

Praktikant am Lebensmittelinstitut Braunschweig

11/2000 – 10/2001 Abschluss: 2. Staatsexamen,
Staatlich geprüfter Lebensmittelchemiker

Beruflicher Werdegang

05/2002 – 04/2005 Doktorand an der Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung (BAM); Thema der Arbeit: *"Methodenentwicklung zur Bestimmung von Ochratoxin A in Lebensmitteln mittels LC-MS/MS"*

seit 07/2005 angestellt als Prüfleiter im Analytischen Zentrum Biopharm Berlin GmbH; Schwerpunkte im Bereich der Bio- und Pharmazeutischen Analytik sowie der Qualitätssicherung nach GLP

12 Literaturverzeichnis

- 1 J. Bauer, M. Gareis, „Ochratoxin A in der Nahrungskette“, J. Vet. Med. B **34** (1987) 613-627.
- 2 J. G. Szekely, W. S. Chelack, S. Delaney, R. R. Marquardt, A. A. Frohlich, „Scanning electron microscope observations of growth and ochratoxin A production of *Aspergillus alutaceus* variety (formerly *A. ochraceus*) on gamma-irradiated barley“, Food Structure **10** (4) (1991) 295-302.
- 3 S. Vasanthi, R.V. Bath, „Mycotoxin in food occurrence health and economic significance & food control measures“, Ind. J. Med. Res. **108** (1998) 212-224.
- 4 A. Pfohl-Leszkowicz, T. Petkova-Bocharova, I.N. Czernozemsky, M. Castergnaro, „Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumors: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins“, Food Addit. Contam. **19** (2002) 282-302.
- 5 M.M. Abouzied, A.D. Horvath, P.M. Podlesny, N.P. Regina, V.D. Metodiev, R.M. Kamenova-Tozeva, N.D. Niagolova, A.D. Stein, E.A. Petropoulos, V.S. Ganey, „Ochratoxin A concentrations in food and feed from a region with Balkan Endemic Nephropathy“, Food Addit. Contam. **19** (2002) 755-764.
- 6 K.J. Van der Merwe, P.S. Steyn, L. Fourie, B. De Scott, J.J. Theron, „Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*“, Wilh. Nature **56** (1965) 1112-1113.
- 7 F.J. Cabanes, F. Accensi, M.R. Bragulat, M.L. Abarca, G. Castella, S. Minguez, A. Pons, „What is the source of ochratoxin A in wine?“, Int. J. of Food Microbiol. **79** (2002) 213-215.
- 8 M.L. Abarca, M.R. Bragulat, G. Castella, F.J. Cabanes, „Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*“, Appl. Environ. Microbiol. **60** (1994) 2650-2652.
- 9 H.A. Palacios Cabrera, M.H. Taniwaki, H.C. Menezes, B.T. Iamanaka, S.A. Salgado, „Ochratoxin A Production by *Aspergillus Ochraceus* in Raw Coffee as Affected by Alternating Temperatures and Different Water Activity Values“, Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, Av Brasil, 2880 – 13.073-001, Campinas-SP, Brazil.
- 10 M.H. Taniwaki, J.I. Pitt, A.A. Teixeira, B.T. Iamanaka, „The Source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods“, Int. J. Food Microbiol. **65** (2001) 39-44.
- 11 E. D. Baxter, I. R. Slaiding, B. Kelly, „Behaviour of OTA in Brewing“, J. Am. Soc. Brew. Chem. **59** (3) (2001) 98-100.
- 12 F.S. Chu, C.C. Chang, S.H. Ashoor, N. Prentice, „Stability of aflatoxin B₁ and ochratoxin A in brewing“, Appl. Microbiol. **29** (1975) 313-316.

- 13 W.K. Nip, F.C. Chang, F.S. Chu, N. Prentice, „Fate of Ochratoxin A in brewing“, *Appl. Microbiol.* **30** (1975) 1048-1049.
- 14 A. Leitner, P. Zöllner, A. Paolillo, J. Stroka, A. Papadopoulou-Bouraoui, S. Jaborek, E. Anklam, W. Lindner, „Comparison of methods for the determination of ochratoxin A in wine“, *Anal. Chim. Acta* **453** (2002) 33-41.
- 15 M. Nakajima, H. Tsubouchi, M. Miyabe, „A survey of ochratoxin A and aflatoxins in domestic and imported beers in Japan by immunoaffinity and liquid chromatography“, *Journal of AOAC International*, **82** (4) (1999) 897-902.
- 16 M. Solfrizzo, G. Avataggiato, A. Visconti, „Use of various clean-up procedures for the analysis of ochratoxin A in cereals“, *J. Chromatogr. A* **815** (1998) 67-73.
- 17 E. E. Creppy, I. Baudrimont, A.-M. Betbeder, „Prevention of nephrotoxicity of ochratoxin A, a food contaminant“, *Toxicol. Letters* **82/83** (1995) 869-877.
- 18 E. Petzinger, A. Weidenbach, „Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins“, *Livestock Production Science* **76** (2002) 245-250.
- 19 E. Petzinger, K. Ziegler, „Ochratoxin A from a toxicological perspective“, *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **23** (2000) 91-98.
- 20 N.P. Ferreira, M.J. Pitout, „The biosynthesis of ochratoxin“, *Journal of the South-African Chemical Institute* **22** (1969) S.1
- 21 R.D. Wei, F.M. Strong, E.B. Smalley, „Incorporation of chlorin-36 into ochratoxin A“, *Applied Microbiology* **22** (1971) 276-277.
- 22 Römpp Chemie Lexikon, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1995).
- 23 P.S. Steyn, C.W. Holzapfel, „The biosynthesis of the ochratoxins, metabolites of *aspergillus ochraceus*“, *Phytochemistry* **9** (1970) 1977-1983.
- 24 J.P. Harris, P.G. Mantle, „Biosynthesis of ochratoxins by *aspergillus ochraceus*“, *Phytochemistry* **58** (2001) 709-716.
- 25 F.S. Chu, „Studies on ochratoxins“, *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **2** (4) (1974) 449-524.
- 26 F.C. Stormer, C.E. Hansen, J.I. Pedersen, G. Hvistendahl & A.J. Aasen, „Formation of (4R)- and (4S)-4-hydroxyochratoxin A from ochratoxin A by liver microsomes from various species“, *Appl. Environ. Microbiol.* **42** (1981) 1051-1056.
- 27 Y. Münster, R. Blank, S. Wollfram, Erster Arbeitsbericht der Arbeitsgruppe Lebensmittelqualität- und Sicherheit der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel 2002.

- 28 R. Hadidane, H. Bacha, E.E. Creppy, „Isolation and structure determination of natural analogues of the mycotoxin ochratoxin A produced by *aspergillus ochraceus*“, *Toxicology* **76** (1992) 233-243.
- 29 E. E.Creppy, K. Chakor, M. J. Fisher, G. Dirnheimer, „The mycotoxin ochratoxin A is a substrate for phenylalanin hydroxylase in isolated rat hepatocytes and in vivo“, *Arch. Toxicol.*
- 30 P. Krogh, „Role of ochratoxin in disease causation“, *Fd. Chem. Toxicol.* **30** (1992) 213-224.
- 31 E.E. Creppy, „Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe“, *Toxicol. Letters* **127** (2002) 19-28.
- 32 M. Gekle, G. Schwerdt, R. Freudinger, S. Mildenerberger, D. Wilfingseder, V. Pollack, M. Dander, H. Schramek, „Ochratoxin A induces JNK activation and apoptosis in MDCK-C7 cells at nanomolar concentrations“, *Pharmacol. Exp. Ther.*, **293** (3) (2000) 837-844.
- 33 M. Gekle, S. Silbernagel, „Renal toxicodynamics of ochratoxin A: pathophysiological approach“, *Kidney Blood Press. Res.*, **19** (5) (1996) 225-235.
- 34 A. Thuvander, A. Breitholtz-Emanuelsson and M. Olsen, “Effects of ochratoxin A on the mouse immune system after subchronic exposure”, *Food chem. Toxicol.* **33** (1995) 1005-1011.
- 35 A. Thuvander, A. Breitholtz-Emanuelsson, D. Brabencova, I. Gadhasson, “Prenatal exposure of balb/c mice to ochratoxin A: Effects on the immune system in the offspring”, *Food chem. Toxicol.* **34** (1996a) 547-554.
- 36 A. Thuvander, E. Funseth, A. Breitholtz-Emanuelsson, I. Hallén Palmiger and A. Oskarsson, “Effects of ochratoxin A on the rat immune system after perinatal exposure”, *Natural Toxins*, (1996b) 141-147.
- 37 A. Bruinink and C. Sidler, “The neurotoxic effects of ochratoxin A reduced by protein binding but are not affected by *l*-phenylalanine”, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **146** (1997) 173-179.
- 38 F. Monet-Tschudi, O. Sorg, P. Honegger, M. Zurich, A.C. Huggett and B. Shilter, “Effects of naturally occurring food mycotoxin ochratoxin A on brain cells in culture”, *Neuro Toxicology* **18** (1997) 831-840.
- 39 A.M. Bedele, W.W. Carlton, P. Krogh, E.B. Lillehoj, „Ochratoxin A carcinogenesis in the (C57BL/6JxC3H)F₁ mouse“, *J. Natl. Cancer inst.* **75** (1985) 773-742.

- 40 K. Imaida, M. Hirose, T. Ogiso, Y. Kurata, N. Ito, „Quantitative analysis of initiating and promoting activities of five mycotoxins in liver carcinogenesis in rats“, *Canc. Letters* **16** (1982) 137-143.
- 41 A. Scibelli, S. Tafuri, M.C: Ferrante, E. Alimenti, B. Naso, A. Lucisano, N. Staiano, R. Della Morte, „ochratoxin A affects COS cell adhesion and signaling“, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **192** (2003) 222-230.
- 42 A. Benesic, S. Mildenerger, M. Gekle, *Pflugers Arch.*, **439** (3) (2000) 278-287.
- 43 G. Schwerdt, R. Freudinger, S. Mildenerger, S. Silbernagel, M. Gekle, *Cell Biol. Toxicol.* **15** (6) (1999) 405-415.
- 44 IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: „Some naturally occurring substances; food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins“, International Agency for Research on Cancer, Geneva, **56** (1993) 489-521.
- 45 IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans (1993) International Agency for Research on Cancer, Geneva, 56: 489-521
- 46 H. Valenta, Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids, *J. Chromatogr. A* **815** (1998) 75-92.
- 47 S. Uchiyama, Y. Saito, M. Uchiyama, *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **26** (1985) p. 651.
- 48 C. Dall'Asta, G. Galaverna, A. Dossena, R. Marchelli, „Reversed-phase liquid chromatographic method for the determination of ochratoxin A in wine, *J. Chromatogr. A* **1024** (2004) 275-279.
- 49 J. Wolff, H. Bresch, G. Cholmakow-Bodechtel, G. Engel, M. Gareis, P. Majerus, H. Rosner, R. Scheuer, „Belastung des Verbrauchers und der Lebensmittel mit Ochratoxin A“, *Proceedings des 21. Mykotoxin-Workshops*, 7.-9. Juni 1999, Jena, S. 139.
- 50 Verordnung (EG) Nr. 472/2002 der Kommission vom 12. März 2002 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 466/2001 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln.
- 51 Verordnung (EG) Nr. 123/2005 der Kommission vom 26. Januar 2005 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 466/2001 in Bezug auf Ochratoxin A.
- 52 Verordnung (EG) Nr. 683/2004 der Kommission vom 13. April 2004 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 466/2001 im Hinblick auf Aflatoxine und Ochratoxin A in Lebensmitteln für Säuglinge und Kleinkinder.
- 53 EN ISO 15141-1 „Bestimmung von Ochratoxin A in Getreide und Getreideerzeugnissen“
- 54 DIN EN 14132 „Bestimmung von Ochratoxin A in Gerste und Röstkaffee“.

- 55 DIN EN14133: Bestimmung von Ochratoxin A in Wein und Bier
- 56 L. Sibanda, S. de Saeger, C. van Peteghem, „Optimization of solid-phase clean-up prior to liquid chromatographic analysis of ochratoxin A in roasted coffee“, J. Chromatogr. A **959** (2002) 327-330.
- 57 M. Becker, P. Degelmann, M. Herderich, P. Schreier, H.-U. Humpf, „Column liquid chromatography -electrospray ionisation- tandem mass spectrometry for the analysis of ochratoxin“, J. Chromatogr. A, **818** (1998) 260-264.
- 58 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG) L 15.00 1 Bestimmung von Ochratoxin A in Getreide und Getreideprodukten.
- 59 A. Visconti, M. Pascale, G. Centonze, „Determination of ochratoxin A in domestic beers and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography“, J. Chromatogr. A, **888** (2000) 321-326.
- 60 J. M. Saez, A. Medina, J.V. Gimeno-Adelantado, R. Mateo, M. Jimenez (2004) J. Chromatogr. A 1029: 125-133.
- 61 D. Jornet, O. Busto, J. Guasch, Solid-phase extraction applied to determination of ochratoxin A in wines by reversed-phase high-performance liquid chromatography J. Chromatogr. A, **882** (2000) 29-35.
- 62 Bruker Daltonics, „Application of LC-ESI Ion Trap MS for Quantitation of Ochratoxin in Plant Extracts“, Application Note LCMS-16 (2001)
- 63 Y. Jiao, W. Blaas, C. Rühl, R. Weber, J. Chromatogr. **595** (1992) 364-367.
- 64 P. Zöllner, A. Leitner, D. Lubda, K. Cabrera, W. Lindner, Chromatographia 52 (2000) 818.
- 65 B.P.-Y. Lau, P. M. Scott, D. A. Lewis, S. R. Kanhere, „Quantitative determination of ochratoxin A by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry“, J. Mass Spectrom. **35** (2000) 23-32.
- 66 B.P.Y. Lau, P.M. Scott, D.A. Lewis, S.R. Kanhere, „Abstracts of 45th ASMS Conference of Mass Spectrometry and Allied Topics, Palm Springs, CA, 1-5 June (1997), 687.
- 67 K. Cammann, „Instrumentelle Analytische Chemie“, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg; Berlin 2001
- 68 E. Martinez, M. Gros, S. Lacorte, D. Barcelo, „Simplified procedures for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediments and mussels“, J. Chromatogr. A **1047** (2004) 181-188.

- 69 L. Pallaroni, C. von Holst, „Determination of zearalenone from wheat and corn by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry“, J. Chromatogr. A **993** (2003) 39-45.
- 70 M. Zhao, Y. Liu, Y. Li, X. Zhang, W. Chang, „Development and characterization of an immunoaffinity column for selective extraction of bisphenol A from serum samples“, J. Chromatogr. B **783** (2003) 401-410.
- 71 M.L. Martins, H.M. Martins, „Aflatoxin M₁ in yoghurts in Portugal“, Int. J. of Food Microbiol. **91** (2004) 315-317.
- 72 M. Koch, S. Steinmeyer, R. Tiebach, R. Weber, P. Weyerstahl, „Bestimmung von Ochratoxin A in Röstkaffee“, Deutsche Lebensmittelrundschau 92. Jahrg. Heft 2 1996, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- 73 Georg Schwedt, „Chromatographischen Trennmethode“, 2. verbesserte und erweiterte Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart; New York 1986.
- 74 K.K. Unger, Handbuch der HPLC, GIT Verlag Darmstadt 1989.
- 75 G. Aced, H.L. Möckel, Liquidchromatographie, VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim; New York; Basel; Cambridge 1991.
- 76 S. Kromidas, „HPLC-Tips“, Band I, Hoppenstedt, Darmstadt 1997.
- 77 H. Budzikiewicz, „Massenspektrometrie – Eine Einführung“, VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim; New York; Basel; Cambridge 1992.
- 78 Zeleny, J. The Physical Review **3** (1914) 69-91.
- 79 M. Yamashita, J.B. Fenn, J. Phys. Chem. **88** (1984) 4451-4459.
- 80 C.M. Whitehouse, R.N. Dreyer, M. Yamashita, J.B. Fenn, Anal. Chem. **57** (1985) 675-679.
- 81 Lord Rayleigh, Philos. Mag. **14** (1882) 184.
- 82 P. Kebarle, „A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry“, J. Mass Spectrom. **35** (2000) 804-817.
- 83 P. Kebarle, M. Peschke, „On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions“, Anal. chim. Acta **406** (2000) 11-35.
- 84 J.V. Irbane, B.A. Thomason, J. Chem. Phys. **64** (1976) 2287-2292.
- 85 Agilent Technologies, „Agilent 1100 Series LC/MSD Trap Techniques and Operation“ Course Number H8966A **1** (2003) 12-18.
- 86 M.S. Wilm, M. Mann, „Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source“ Anal. Chem. **68** (1996) 1-8.

- 87 A.F. Forti, G. Campana, A. Simonella, M. Multari, G. Scortichini, „Determination of chloramphenicol in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry“, *Anal. Chim. Acta* **529** (2005) 257-263.
- 88 Y. Zhang, X. Chen, Q. Gu, D. Zhong, „Quantification of rabeprazole in hman plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry“, *Anal. Chim. Acta* **523** (2004) 171-175.
- 89 D.A. Skoog, J.J. Leary, *Instrumentelle Analytik: Grundlagen – Geräte – Anwendungen*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1996).
- 90 G. Stoev, A. Michailova, „Quantitative assessment of the reliability of identification by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry“, *J. Chromatogr. A* **1031** (2004) 11-16.
- 91 EURACHEM/CITAC Guide, „Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement“, Second Edition (2000) P1.
- 92 H. Xiao, R.R. Marquardt, A.A. Frohlich, Y.Z. Ling, „Synthesis and Structural Elucidation of Analogs of Ochratoxin A“ *J. Agric. Food Chem.* **43** (1995) 524-530.
- 93 A.E. de Jesus, P.S. Steyn, R. Vleggar, P.L. Wessels, „Carbon-13 nuclear magnetic resonance assignments and biosynthesis of the mycotoxin ochratoxin A“, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transaction* **1** (1980) 52-54.
- 94 Entscheidung 2002/657/EG der Kommission vom 14. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen, bekannt gegeben unter Aktenzeichen K(2002) 3044.
- 95 S. Kromidas, „Validierung in der Analytik“, Wiley-VCH 2000.
- 96 BAM Leitfaden zur Ermittlung und Angabe von Messunsicherheiten bei quantitativen Prüfergebnisseen (Entwurf 30.01.2004).
- 97 DIN 32645 Chemical Analysis; Decision limit, Detection limit and Determination limit; Estimation in case of repeatability, terms, methods, evaluation
- 98 DIN EN ISO/IEC 17025, „Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien“, (2000).
- 99 E. Becker, A. Hentschel, E. Kirchhoff, „Validierung von Vitamin B₁ mittels HPLC“, Posterbeitrag zum 33. Deutschen Lebensmittelchemikertag (Bonn, 2004).
- 100 Richtlinie 2002/26 vom 13. März 2002 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle der Ochratoxin A-Gehalte in Lebensmitteln.

- 101 M. Reinsch, A. Töpfer, A. Lehmann, I. Nehls, „Determination of ochratoxin A in wine by LC-MS/MS after combined anion exchange/reversed phase clean-up“, *Anal and Bioanal Chem* (2005) 381: 1592-1595.
- 102 Souci, Fachmann, Kraut, „Die Zusammensetzung der Lebensmittel/Nährwert-Tabellen“, Medpharm Scientific Publishers (Online-Datenbank Februar 2005).
- 103 V.G. Curtui, M. Gareis, „A simple HPLC method for the determination of the mycotoxins ochratoxin A and B in blood serum of swine“, *Food Addit. Contam.* **18** (2001) 635 – 643.
- 104 M. Reinsch, A. Töpfer, A. Lehmann, I. Nehls, U. Panne, „*Determination of ochratoxin A in beer by LC-MS/MS ion trap detection*“ akzeptiert als Publikation in *Food Chemistry*.
- 105 Analyst Tutorial Version 1.4, Applied Biosystems MDS Sciex 2003.
- 106 European Commission (2002): BCR Information – GUIDELINES for Feasibility Studies on Certified Reference Materials. Directorate-General for Research (EUR 20574 EN).
- 107 A. Lamberty, H. Schimmel, J. Pauwels, „The study of the stability of reference materials by isochronous measurements“, *Fres. J. Anal. Chem.* **360** (1998) 359-361.
- 108 BAM Qualitätsmanagementhandbuch, „Homogenität und Stabilität fester Referenzmaterialien“, QMH-I.21-7.037 (2003).
- 109 DIN ISO 5725-1, „Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen – Allgemeine Grundlagen und Begriffe“, (1994).
- 110 M. Lindenmeier, P. Schieberle, M. Rychlik, „Entwicklung einer Isotopenverdünnungsanalyse für das Mykotoxin Ochratoxin A in Lebensmitteln“, Posterbeitrag zur Jahrestagung Chemie, München, 6-11 Oktober 2003.
- 111 M. Lindenmeier, P. Schieberle, M. Rychlik, „Quantification of ochratoxin A in food by a stable isotope dilution assay using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry“, *J. of Chromat.* **1023** (2004) 57-66.